

Andrea Schiffmann

Analyse des Zeitverlaufs der Tau-Protein-Aggregation
und Identifikation toxischer Aggregationsintermediate

Eingereicht als

Bachelorarbeit

an der

HOCHSCHULE MITTWEIDA

UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Mathematik, Naturwissenschaften, Informatik

Leipzig, 2010

Erstprüfer: Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer: PD Dr. Max Holzer

Die vorgelegte Arbeit wurde verteidigt am:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung: Theoretische Grundlagen	1
1.1 Die Alzheimersche Erkrankung – eine neurodegenerative Krankheit mit besonderem Forschungsinteresse	1
1.2 Die Symptomatik der Alzheimerschen Erkrankung	1
1.3 Histopathologische Marker der Alzheimerschen Erkrankung	3
1.3.1 Das Tau-Protein und aus seiner Aggregation resultierende Alzheimer-Fibrillen	3
1.3.2 Amyloid- β , senile Plaques und die Rolle von Mutationen	6
1.3.3 Entzündungsherde	8
1.4 Therapiestrategien gegen die Alzheimersche Erkrankung	9
1.4.1 Derzeitige Therapiestrategien	9
1.4.2 Beispiele derzeitiger Forschungsarbeiten in Bezug auf neue Therapiestrategien	10
1.5 Theoretischer Bezug zu den Versuchen: besondere Eigenschaften und Aggregation des Tau-Proteins	12
2 Ziel der Arbeit	14
3 Material & Methoden	16
3.1 Material	16
3.1.1 Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Molekulargewichtsmarker, Plasmide	16
3.1.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software	18
3.1.3 Medien, Lösungen, Puffer	19
3.2 Methoden	23
3.2.1 Transformation kompetenter E.coli-Zellen BL21 mit dem Plasmid prk172-ht40	23
3.2.2 Expression des Tau-Proteins in transformierten BL21-Zellen	23
3.2.3 Zellaufschluss	23
3.2.4 Aufreinigung des Tau-Proteins mit Hilfe DEAE- und Phosphocellulose	24
3.2.5 Ammoniumsulfat- und Hitzefällung des Tau-Proteins	25
3.2.6 Gelfiltration und anschließende Aufkonzentrierung des gefällten Tau-Proteins	25
3.2.7 Dialyse des aufkonzentrierten Tau-Proteins	26

3.2.8 Herstellung verschiedener Aggregationsansätze und anschließende Gelfiltration	26
3.2.9 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	27
3.2.10 Western-Blot- Verfahren und Immunfärbung des Tau-Proteins auf der PVDF-Membran	27
3.2.11 Thioflavin S- und ANS-Assay	28
3.2.12 Protein-Konzentrations-Bestimmung mit Fluorescamin	29
3.2.13 Oligomer-ELISA	30
3.2.14 LDH- und MTT zur Untersuchung der in-vitro-Toxizität der gesammelten Tau-Fraktionen	30
4 Ergebnisse	32
4.1 Charakterisierung verschiedener Tau- Aggregationsansätze mittels Größenausschlusschromatographie	32
4.2 Untersuchung ausgewählter FPLC-Fraktionen auf Proteinmenge „denaturiertes“ Tau-Protein und β -Faltblattstrukturen	38
4.3 Oligomer-ELISA	42
4.4 MTT- Assay	44
4.5 LDH- Assay	49
4.6 Western Blot	53
5 Diskussion	54
6 Resümee und Ausblick	57
7 Danksagung	58
Referenzen	VI
Eidesstattliche Erklärung	X

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimersche Erkrankung (<i>Alzheimer's disease</i>)
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>amyloid precursor protein</i>)
A β	Amyloid- β
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4- Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EEG	Elektroenzephalografie
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FKS	fetales Kälberserum
GOF	gain-of-function
FTDP-17	Chromosom 17-gekoppelte Frontotemporale Demenz und Parkinsonismus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LOF	loss-of-function
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NFT's	Neurofibrillenbündel (<i>neurofibrillary tangles</i>)
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PHF	paarige helikale Filamente
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>) mit Tween-20
ü.N.	über Nacht
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: sichtbare Gesamtgrößenabnahme und Vertiefung der Hirnfurchen in einem AD-betroffenen Gehirn im Vergleich zur Kontrolle [Gärtner, PFI Leipzig]	2
Abbildung 2: links: markiertes Amyloid-Plaque, rechts: markiertes Neurofibrillenbündel [Gärtner, PFI Leipzig]	4
Abbildung 3 Lokalisation und Funktion des Tau-Proteins in gesunden	5
Abbildung 4: Tau- und Tangle-Hypothese [Mudher & Lovestone, 2002]	6
Abbildung 5 Amyloid-Kaskaden-Hypothese [Mudher & Lovestone, 2002]	7
Abbildung 6: Einfluss von Anionen auf die Protein-Aggregation [Friedhoff et al., 1998].	13
Abbildung 7: Schema der Aggregation des Tau-Proteins.	15
Abbildung 8: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration der	32
Abbildung 9: 8% iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 0h-Aggregationsansatzes,	33
Abbildung 10: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 24h-Aggregationsansatzes	33
Abbildung 11: 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 24h-Aggregationsansatzes	34
Abbildung 12: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 72h-Aggregationsansatzes; Pfeil: Verbreiterung des Oligomerpeaks in Richtung Filament	35
Abbildung 13: 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 72h-Aggregationsansatzes	36
Abbildung 14: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 120h-Aggregationsansatzes	36
Abbildung 15: 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 120h-Aggregationsansatzes	37
Abbildung 16: Fluoreszenz-Assays des 0h-Aggregationsansatzes	38
Abbildung 17: Fluoreszenz-Assays des 24h-Aggregationsansatzes	39
Abbildung 18: Fluoreszenz-Assays des 72h-Aggregationsansatzes	40
Abbildung 19: Fluoreszenz-Assays des 120h-Aggregationsansatzes	41
Abbildung 20: BSA-Eichkurve zur Gesamtproteinmengenbestimmung	42
Abbildung 21: Oligomer-ELISA: bei 4 °C aufbewahrte FLPC-Fraktionen	43
Abbildung 22: Oligomer-ELISA: bei -70 °C eingefrorene FPLC-Fraktionen	43

Abbildung 23: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit unaggregiertem Tau-Protein	44
Abbildung 24: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 24h aggregiertem Tau-Protein	45
Abbildung 25: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 72h aggregiertem Tau-Protein	46
Abbildung 26: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 120h aggregiertem Tau-Protein	47
Abbildung 27 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit unaggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden	49
Abbildung 28 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit 24h-aggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden	50
Abbildung 29 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit 72h-aggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden	51
Abbildung 30 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit 120h-aggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden	52
Abbildung 31: Nachweis des Tau-Proteins nach dem MTT-Test im Western Blot	53

1 Einleitung: Theoretische Grundlagen

1.1 Die Alzheimersche Erkrankung – eine neurodegenerative Krankheit mit besonderem Forschungsinteresse

Die Alzheimersche Erkrankung (engl. Alzheimer's disease, kurz: AD), von der immer mehr Menschen direkt oder indirekt betroffen sind¹, ist eine progressive, degenerative Hirnerkrankung, bei der es zu einem Funktionsverlust kommt. Sämtliche Symptome, die im Krankheitsverlauf auftreten, gehen auf den Synapsenverlust und die Degeneration von Nervenzellen zurück [Graf, 2002]. Trotz weitreichender Forschung existiert bisher noch keine kausale Therapie gegen diese häufige Form der Demenz.

Aufgrund von jährlich ca. 50000 Neuerkrankungen allein in Deutschland [URL - I] und der damit relativ weiten Verbreitung ist ein enormes Forschungsinteresse zu verzeichnen, welches die kontinuierliche Gewinnung neuer Erkenntnisse fördert. Diese bilden die Grundlage für Forschungsarbeiten, bei denen angestrebt wird, pathologischen Veränderungen und dem einhergehenden kognitiven Verfall entgegenzuwirken und/oder vorzubeugen. Hierbei sind oft so genannte Tiermodelle hilfreich, welche Aspekte der Pathologie im Menschen vereinfacht darstellen und so Informationen zur Erforschung zukünftiger Medikamente liefern können.

Viele potentielle Medikamente befinden sich derzeit in der Entwicklung oder klinischen Testverfahren.

1.2 Die Symptomatik der Alzheimerschen Erkrankung

Verschiedene Erkrankungsbilder, die mit dem Verlust kognitiver Funktionen einhergehen, werden zusammenfassend als Demenzen bezeichnet. So ist die AD, welche etwa 60% aller Demenzen ausmacht, unter dem Namen „neurodegenerative Demenz“ bekannt [URL - II]. Alle Demenzen, so auch die AD, sind klinische Syndrome, die zu einem stetigen Verlust der Hirnfunktion führen. Nicht zuletzt deshalb sollte die Diagnose „AD“ so früh wie möglich getroffen werden, um der beginnenden Krankheit bestmöglich entgegenzuwirken. Allerdings ist dies prä-mortem bisher nur anhand von Funktionstests (standardisiertes Erfassen von Einschränkungen der kognitiven Leistungsfähigkeit in psychologischen Tests) möglich. Einen potentiellen Irrtumsschwerpunkt stellen hierbei zum einen der

¹ Bis zum Jahre 2050 weltweit 100 Mio. Patienten, laut aktuellen Schätzungen [Schneider et al., 2010]

altersbedingte Abbau der geistigen Leistungen und zum anderen Erkrankungen mit AD-ähnlichen Symptomen dar, die jedoch andere Therapien erfordern [Berg et al., 1994].

Die schleichend beginnende AD zeichnet sich hierbei primär durch Gedächtnisstörungen aufgrund pathologischer Veränderungen des zerebralen Nervengewebes aus. Bei Patienten mit beginnender AD treten verschiedene Symptome auf, wie z.B. Schlaflosigkeit, Verstopfung, Reizbarkeit, sowie eine Tendenz zu Verwirrungen z.B. bei der Änderung vereinbarter Zeiten. Derartige Symptome sind auch für andere Erkrankungen charakteristisch, was eine frühzeitige Diagnose erschwert. Betroffene versuchen häufig, die aufkommenden Schwierigkeiten zu verbergen, was es für Bekannte nicht einfach macht, das Problem zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es häufig zu Schwierigkeiten mit der Orientierung und dem Gedächtnis, welche für Außenstehende offensichtlicher werden. Neben zunehmender Hilflosigkeit kann es dazu kommen, dass Betroffene so genannte primitive Reflexe aufzeigen (z.B. Greifreflex durch das Streicheln der Handinnenfläche), welche eigentlich bei Kindern zu beobachten sind. In der Spätphase der AD kommt es zu einer Störung der Persönlichkeit mit erheblichen Einschränkungen aller geistigen, motorischen und sensorischen Fähigkeiten, woraufhin die Patienten auf fremde Hilfe angewiesen sind. Neuropathologische Untersuchungen nach dem Tod von Betroffenen belegen eine Erweiterung der Ventrikel und somit eine verstärkte Ausprägung der Hirnfurchen (was den Verlust an Hirnmasse erklärt), [Berg et al., 1994] wie in Abbildung 1 zu erkennen ist.

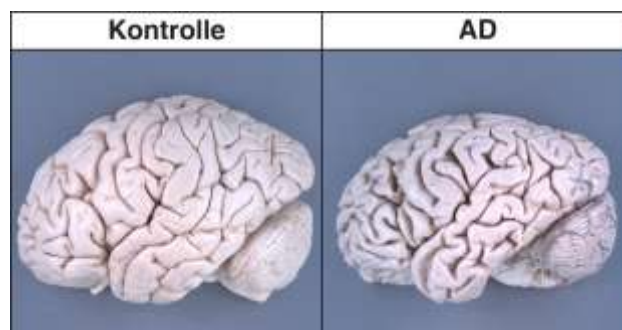


Abbildung 1: sichtbare Gesamtgrößenabnahme und Vertiefung der Hirnfurchen in einem AD-betroffenen Gehirn im Vergleich zur Kontrolle [Gärtner, PFI Leipzig]

Außerdem kommt es zu einer Abnahme der Hirndurchblutung (woraufhin sich ebenfalls die Hirnsauerstoffaufnahme verringert), oft zeigt das EEG eine Verlangsamung des Grundrhythmus. Diese allmählich, aber stetig fortschreitenden Beeinträchtigungen können durch eine plötzliche Umstellung der Lebensweise beschleunigt werden [Berg et al., 1994].

Mit Aufmerksamkeit, Gedächtnis, verbalen und visuell-räumlichen Fähigkeiten, Problemlösung sowie logischem Denken werden durch die AD mehrere Bereiche der gedächtnisspezifischen Leistungen beeinträchtigt. Fibrillen und Amyloid-Plaques treten als histopathologische Marker (im nächsten Gliederungspunkt näher beschrieben) vermehrt im Hippocampus und entorhinalen Cortex auf, wo die Veränderungen beginnen. In der Großhirnrinde (Bereiche für Assoziationen, Gedächtnis und Interpretation) treten sie erst später auf, weshalb das episodische Gedächtnis bereits vor der Diagnosestellung betroffen ist. Die so genannte Hippocampus-Atrophie (Gewebeschwund, bzw. Größenabnahme der Neuronen) korreliert hierbei mit dem Grad der Gedächtnisbeeinträchtigung [Graf, 2002].

1.3 Histopathologische Marker der Alzheimerschen Erkrankung

1.3.1 Das Tau-Protein und aus seiner Aggregation resultierende Alzheimer-Fibrillen

Ansätze zur Medikamentenforschung ergeben sich aus der Erkenntnis, dass sogenannte senile Plaques und Alzheimer-Fibrillen zu der Degeneration der Nervenzellen beitragen [Berg et al., 1994]. Diese pathogenen Mechanismen der Neurodegeneration liegen in der Ausbildung filamentöser Protein-Ablagerungen begründet: intrazellulär als Tau-Filamente, extrazellulär als Amyloid-Plaques [McGeer & McGeer, 2006]. Bei Erkrankungen mit Tau-Aggregaten (Tauopathien), welche in diesem Abschnitt näher erläutert werden, bilden sich aus hyperphosphoryliertem Tau „paarige helikale Filamente“ (PHF) [Lee et al., 2004], welche sich zu (multimeren) intrazellulären Neurofibrillenbündeln (engl. neurofibrillary tangles, NFT's) zusammenlagern [Crowther & Goedert, 2000].

Tauopathien sind neurodegenerative Erkrankungen, bei denen das Tau-Protein aggregiert. Tau-Proteine sind niedermolekulare, mikrotubuli-assoziierte² Phosphoproteine. Sie fördern die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli und stabilisieren (zusätzlich) bereits vorhandene Mikrotubuli. Bei der AD stellt die Hyperphosphorylierung³ des Tau-Proteins einen zentralen Vorgang der Pathogenese dar. Tau-Protein bindet normalerweise an die vor allem axonalen [Schneider et al., 2010] Mikrotubuli, welche zu den wichtigsten Elementen des Zytoskeletts gehören und vermehrt in Nervenzellen vorhanden sind. Die

² Tau: MAP (engl. microtubule- associatet protein): im Nervensystem von Säugern, reguliert Stabilität und ist für den Aufbau von Mikrotubuli vonnöten [Cleveland et al., 1977]

³ Auslösbar durch ein Missverhältnis im Kinase-Phosphatase-System (Erhöhung der Proteinkinaseaktivität oder Aktivitätsreduzierung der Phosphatase (reguliert Phosphorylierung) [Grundke-Iqbal et al., 1986]

Quervernetzung von benachbarten Mikrotubuli (bei einem Abstand nicht größer als 20 nm) [Hirokawa et al., 1988] erfordert eine Interaktion mit der Oberfläche des gefalteten Proteins Tubulin. Der C-Terminus des Tubulin auf der Mikrotubuli-Oberfläche stellt den physiologischen Interaktionspartner dar [van Bergen et al., 2005]. Somit wird (abseits der AD-Pathologie) die Stabilität des Zytoskeletts gewährleistet [Lee et al., 2004].

Kommt es zu einer Hyperphosphorylierung (Dysregulierung) des Tau-Proteins, hat dies entscheidenden Einfluss auf das normalerweise gut lösliche [Cleveland, 1977] Protein. Je stärker das Tau-Protein phosphoryliert ist, desto geringer ist seine Tubulin- bzw. Mikrotubuli-Bindungsaffinität [Buée et al., 2000], [Honson & Kuret, 2008]. Dies begünstigt die Bildung fibrillärer Einschlüsse und damit klassische AD-Symptome [Brunden et al., 2009].

Klinische Anzeichen sind eine unterbrochene Signalweiterleitung im Axon und die Toxizität von angesammeltem Tau. Nach der Hyperphosphorylierung kommt es zu einer Aggregation, wobei sich die Tau-Einschlüsse zu unlöslichen, filamentösen, Gallyas-positiven NFT's ausbilden [Lee et al., 2004]. Nach dem Absterben der Neurone lassen sich im post mortem- Gehirn von Patienten im späten Stadium der AD intrazelluläre Tangles nachweisen [Mudher & Lovestone, 2002], wie in Abbildung 2 dargestellt ist.

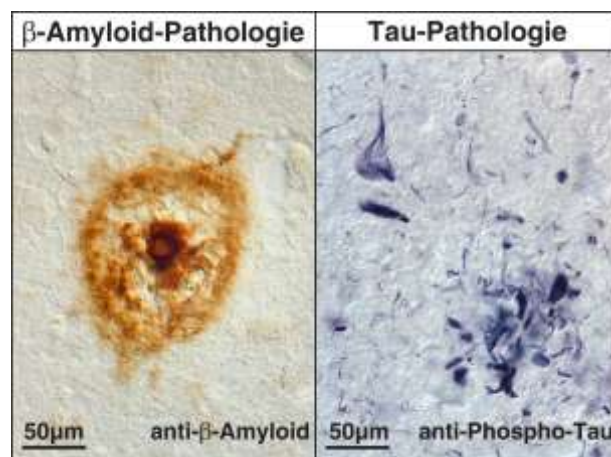


Abbildung 2: links: markiertes Amyloid-Plaques, rechts: markiertes Neurofibrillenbündel [Gärtner, PFI Leipzig]

Das Tau-Protein sammelt sich in Nervenzellkörpern, Axonen und Dendriten, jedoch nicht in Zellkörpern der Astrozyten an. Aggregate bleiben nach dem Tod eines Neurons zurück, was in so genannten „ghost tangles“ resultiert [Honson & Kuret, 2008]. Somit sind Hyperphosphorylierung und frühe Stufen der Akkumulation des Tau erste pathologische Veränderungen, die der AD vorausgehen [Lee et al., 2004].

Es kommt zu einem induzierten Zusammenbruch des Mikrotubuli-Netzwerkes, gefolgt von Nervenatrophie und Neurodegeneration [Le Corre et al., 2006]. Der Funktionsverlust des

Tau und das daraus resultierende Energiedefizit an der Synapse [Schneider et al., 2010] wird auch als LOF (engl. „loss-of-function“) bezeichnet und ist in Abbildung 3 verdeutlicht:

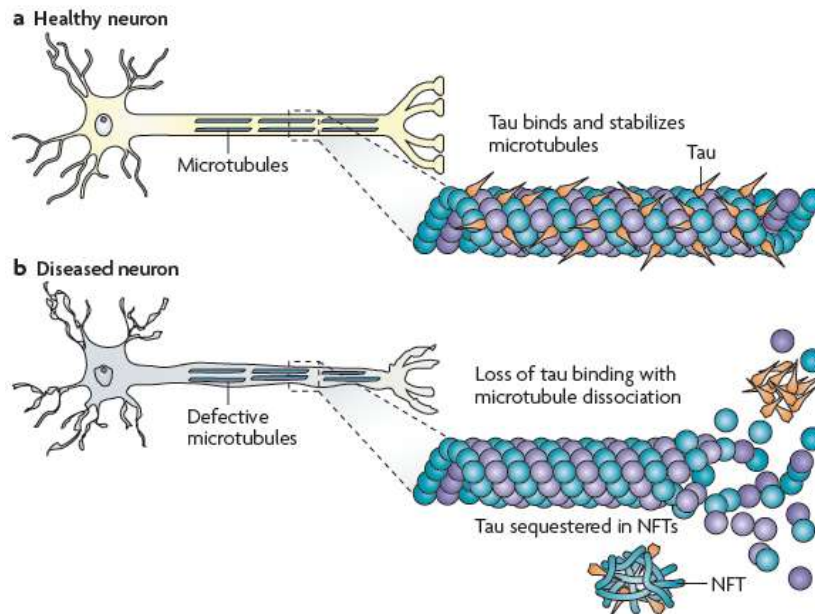


Abbildung 3 Lokalisation und Funktion des Tau-Proteins in gesunden Neuronen (a) und bei Tauopathien (b) [Brunden et al., 2009]

Die Tau-Pathologie bildet die Grundklage der „tau and tangle hypothesis“ (engl., deutsche Übersetzung: Tau- und „Verflechtungen“-Hypothese). Diese ist in Abbildung 4 vereinfacht dargestellt. Die grundlegende Frage lautet, ob NFT's nur ein Epiphänomen der Alzheimerschen Erkrankung sind [Mudher & Lovestone, 2002]. Für diese Hypothese spricht, dass eine Korrelation zwischen der Ausprägung des kognitiven Verfalls und der Dichte der NFT's existiert [Brunden et al., 2009]. Desweiteren wird durch Tangle-Bildung die Phosphorylierung noch verstärkt, wodurch Aggregationen von Tau in Gebieten des Gehirns, die wichtig für das Gedächtnis sind, begünstigt werden [Mudher & Lovestone, 2002].

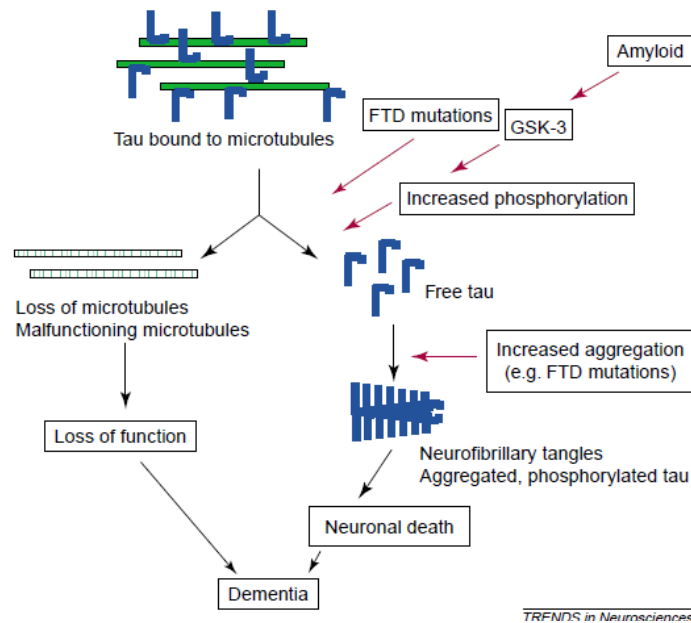


Abbildung 4: Tau- und Tangle-Hypothese [Mudher & Lovestone, 2002]

Das Tau-Protein stellt folglich einen Forschungsschwerpunkt dar, ist jedoch nicht das einzige Pathogen, welches bei der AD von Bedeutung ist. Vielmehr wird vermutet, dass das Tau-Protein mit dem Amyloid- β , welches im nächsten Gliederungspunkt Erklärung findet, während des Krankheitsverlaufs interagiert [Lee et al., 2004].

1.3.2 Amyloid- β , senile Plaques und die Rolle von Mutationen

Als weitere Marker wurden „senile“ Amyloid- Plaques beschrieben, welche neben den NFT's ebenfalls in betroffenen Gehirnen bei der AD zu finden sind. Die Entstehung und Auswirkung der zweiten Hauptpathologie [Mudher & Lovestone, 2002] wird mittels „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ erklärt, welche überblicksweise in Abbildung 5 dargestellt ist.

Ihre Grundlage stellen so genannte Plaques⁴ dar, welche sich bei der AD neben den NFT's ausbilden und als Hauptbestandteil das A β -Peptid enthalten. Im Krankheitsprozess erfolgt bei der APP⁵-Prozessierung eine Dysregulation, wodurch vermehrt das Amyloid-Peptid A β_{1-42} gebildet wird. Durch dessen Aggregation im Plaque-Kern werden Pathologien wie Phosphorylierung und Tau-Aggregation induziert. Diese Tatsache führte die Betrachtungen in erster Linie zu löslichen, oligomeren, intrazellulären A β_{1-42} -Peptiden, welche in Zellkultur toxisch sind [Brunden et al., 2009].

⁴ Dichte, proteinhaltige Kerne, welche von toten oder zerstörten Neuronen umgeben sind [Rogers & Shen, 2000]

⁵ APP: Vorläufer des Amyloid-Proteins

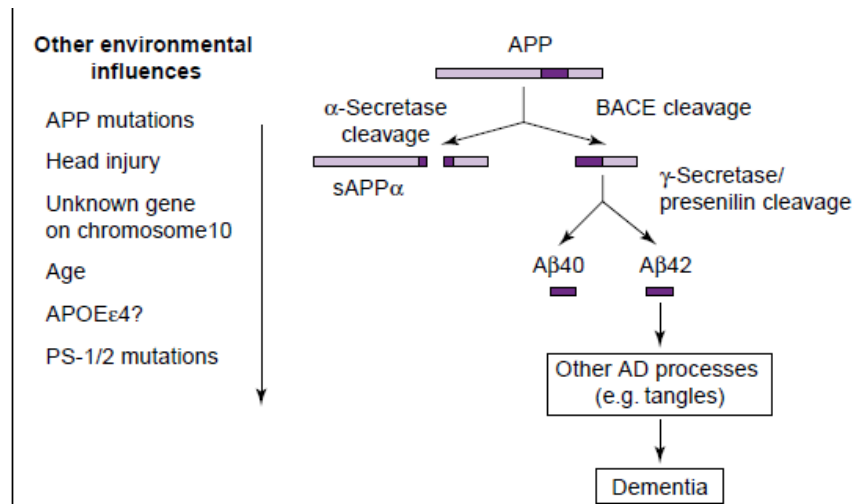


Abbildung 5 Amyloid-Kaskaden-Hypothese [Mudher & Lovestone, 2002]

Allerdings ist die Hypothese nicht vollständig, wie verschiedene Beobachtungen zeigen. So kam es bei transgenen Mäusen mit Mutationen, die zu einem Anstieg der $A\beta_{1-42}$ Menge und einer späteren Plaque-Pathologie führen, oft nur zu einer geringen Tau-Phosphorylierung und keiner Tangle-Bildung oder neuronalen Schwund. Außerdem zeigen Menschen mit Plaques im Kleinhirn oft weder neuronale Defizite, noch eine Tau-Pathologie oder Tangle-Bildung auf [Mudher & Lovestone, 2002].

APP, ein single-pass-, integrale Transmembranprotein, wird durch Proteasen (Sekretasen) in verschiedene Formen des $A\beta$ gespalten. Das $A\beta_{1-42}$ zeichnet sich vor allem durch ein erhöhtes Aggregationspotential aus [Wolfe, 2002]. Eine Mutation der γ -Sekretase, welche APP spaltet, kann eine erhöhte $A\beta_{1-42}$ - Bildung zur Folge haben. Ebenfalls mit AD assoziiert wird das Lipid-bindende Protein Apolipoprotein E (APOE),⁶ sowie erhöhte Cholesterin-Werten im mittleren Alter⁷ [Wolfe, 2002].

Die familiäre Form der Demenz (FTDP-17) tritt in deutlich geringerem Alter als die „klassische“ AD auf. Mutationen am Tau-Gen, wie sie bei der FTDP-17 auftreten, führen nicht zu verstärkter Plaque-Bildung, aber zu Tau-Einschlüssen. Bei Mutationen des APP hingegen kommt es sowohl zu verstärkten Tangles, als auch Plaque-Bildung [Mudher & Lovestone, 2002].

⁶ verschiedene allelische Varianten APOE2, APOE3, APOE4 stehen für unterschiedliche Risiken, eine AD zu entwickeln: APOE2 → geringeres Risiko; APOE4 → höheres AD-Risiko

⁷ Zusammenhang mit Acyl-CoenzymA (Cholesterin Acetyltransferase ACAT): eine pharmakologische Inhibierung oder genetische Mutation von ACAT resultiert in weniger $A\beta$

Im menschlichen Gehirn werden sechs Tau-Isoformen⁸ durch alternatives mRNA-Spleißen der Exons 2, 3 und 10 des Tau-Gens [Brunden et al., 2009] gebildet. Tau- Mutationen beeinflussen die mRNA-Sequenz, was zu verändertem Spleißen und damit anderer Tau-Isoform-Expressionen führt, oder zu Veränderungen der Tau-Aminosäuresequenz, wodurch sich Konformation und damit die Bindungsstellen verändern [Lee et al., 2004]. Exonische Mutationen verändern hierbei als Deletionen oder Missense-Mutationen [Von Bergen et al., 2005] meist die Primärstruktur, intronische Mutationen hingegen verändern das Spleißen und erzeugen somit ein anderes 3R/4R- Verhältnis [Honson & Kuret, 2008]. Bei der Erklärung der AD-Pathologie sollte beachtet werden, dass es sehr wahrscheinlich einen Zusammenhang zwischen A β - Mengen und Tau-Hyperphosphorylierung gibt und beide Prozesse keinesfalls getrennt voneinander zu betrachten sind [Brunden et al., 2009].

1.3.3 Entzündungsherde

Über die beiden Hauptpathologien hinaus spielen auch Entzündungsreaktionen bei der Entwicklung und Progression der AD eine Rolle [Rogers & Shen, 2000]. Diese⁹ stellen eine sekundäre Reaktion im Hirn von Patienten mit AD dar, ohne selbst als primäre Ursache zu fungieren. Hochregulierte Entzündungsmechanismen kolokalisieren hierbei mit Regionen, die große Mengen der AD-Pathologie aufweisen, und sind nicht oder nur wenig in Regionen mit niedriger AD-Pathologie vorhanden. [Wolfe, 2002].

Die schwachen, aber chronischen mit der AD auftretenden Entzündungen haben aufgrund der Empfindlichkeit des ZNS pathophysiologische Relevanz. Außerdem stimuliert die vermehrte Ablagerung anormaler, inerter Stoffe (A β -Aggregate und NFT's) mehrere Entzündungsmechanismen, wodurch chronische Entzündungen eingeleitet und aufrecht erhalten werden können [Wolfe, 2002].

⁸ 3R (3-repeat) und 4R-Isoformen, unterscheiden sich in Anzahl ihrer Mikrotubuli-Bindedomänen und an der Anzahl ihrer enthaltenen Aminosäuren (352 – 441) [Yao et al., 2003]

⁹ Entzündungsmechanismen sind in der Peripherie zytotoxisch, und damit aller Wahrscheinlichkeit nach auch im Gehirn, da das ZNS sehr empfindlich gegenüber Entzündungen ist

1.4 Therapiestrategien gegen die Alzheimersche Erkrankung

1.4.1 Derzeitige Therapiestrategien

Derzeitige Therapien der AD zielen auf eine symptomatische Behandlung ab, welche an den Folge- und Begleitscheinungen ansetzt und den Krankheitsprozess lediglich verzögern bzw. verlangsamen. Der Nervenzellverlust¹⁰ kann derzeit nicht aufgehalten werden [Kurz, 2005].

Behandlungsstrategien umfassen verschiedene Bereiche: So gibt es eine medikamentöse und eine nichtmedikamentöse Behandlung. Antidementiva dienen zur Stabilisierung der geistigen Leistungsfähigkeit, wobei die begrenzte und vorübergehende Wirkung im Idealfall eine Verzögerung von fast einem Jahr erreichen kann (Therapieerfolge sind von Patient zu Patient unterschiedlich). Da eine Verabreichung im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung nur noch zu geringfügiger Verzögerung führt, wurden einige Antidementiva von der Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft als so genannte „Mittel der ersten Wahl“ eingestuft und sollten so früh wie möglich, also mit Diagnosestellung, eingesetzt werden¹¹. Desweiteren werden teilweise Neuroleptika und Antidepressiva eingesetzt, welche eine Milderung, wenn möglich Behebung, von problematischen Verhaltensweisen erzielen sollen¹² [Kurz, 2005].

Die Behandlung ohne Medikamente, welche von ebenso großer Bedeutung ist, umfasst die geistige und körperliche Aktivierung (ohne Überforderung) der Patienten, ausreichende Beratung der Angehörigen, sowie die Wahrung der Umgebungsstabilität [Kurz, 2005]. Im Rahmen der krankheitsbedingten Grenzen gibt es folgende Möglichkeiten verhaltenstherapeutischer Techniken (durch positive Anreize wie Belohnungen): Kognitives Training („spielerisches Lernen“), so genanntes Realitätsorientierungstraining (Wiederholung von Personen, Zeit und Ort betreffende Informationen einschließlich „Realitätsanker“ als direkte Ansprache), Erinnerungstherapie (mehr Lebenszufriedenheit durch positive Erinnerungen) oder Musik- und Kunsttherapie [Gutzmann, 2000].

¹⁰ Bei AD in erster Linie in Hirnrinde und Hirnstamm

¹¹ Bei Erwartung auf Steigerung der Aufmerksamkeit oder Aktivität sollte die Behandlung so lange wie möglich fortgesetzt werden (wenn keine Unverträglichkeiten auftreten).

¹² Da vor allem Antidepressiva allerdings schwer die Psyche beeinflussen, sollte vor deren Einsatz zunächst versucht werden, Begleitsymptome auf nicht-medikamentösem Weg zu behandeln

1.4.2 Beispiele derzeitiger Forschungsarbeiten in Bezug auf neue Therapiestrategien

Entgegen der derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten befinden sich im Forschungsstadium hauptsächlich Therapien für eine dauerhafte Heilung oder Verhinderung des Krankheitsausbruches. Diese setzen direkt an den histopathologischen Markern der AD an. In Bezug auf die Tau-Pathologie gibt es die Überlegung, dass ein Inhibitor der Tau-Hyperphosphorylierung degenerativen Hirnerkrankungen vorbeugen könnte. In bestimmten Mausmodellen wurden dabei bereits Erfolge erzielt, wobei typische motorische Störungen verhindert und unlösliches, aggregiertes hyperphosphoryliertes Tau deutlich verringert werden konnte. Die Vielzahl der Tau-Phosphorylierungsstellen und die daraus resultierende Komplexität der Phosphorylierungs-Muster erschwert die Identifikation von Protein-Kinasen, die zu einer normalen Phosphorylierung beitragen. Dies erschwert die Erforschung wirksamer Medikamente deutlich [Le Corre et al., 2006]. Diese Kinasen sind jedoch entscheidend, da sowohl Veränderungen in der Phosphataseaktivität, als auch bei der Proteinkinase, zu einem Anstieg der Tau-Phosphorylierung mit dem Verlust der eigentlichen Tau-Funktion („loss-of-function“) und einem Anstieg seiner Toxizität („gain-of-function“¹³) führen können [Brunden et al., 2009]. Dennoch konnten bereits einige solcher Kinasen (z.B. ERK1 und ERK2) identifiziert werden, welche in der pathologischen Hyperphosphorylierung von Tau eine Rolle spielen. Eine Inhibierung dieser Kinasen führte in Tiermodellen der Maus oft zu einer Reduzierung der pathologischen Hyperphosphorylierung und z.B. der Vermeidung motorischer Defizite, allerdings konnten NFT's nicht immer verhindert werden [Le Corre et al., 2006]. Außerdem sollte stets auf eventuelle Nebenwirkungen geachtet werden, da viele Kinasen wichtige zelluläre Prozesse, wie den axonalen Transport und das Neuritenwachstum, regulieren [Brunden et al., 2009].

Ein weiterer möglicher Ansatz wäre die Beeinflussung intrazellulärer Cofaktoren, welche zur Bildung von Tau-Fibrillen *in vitro* notwendig sind, wie z.B. Heparin, RNA oder negativ geladene Lipide [Brunden et al., 2009]. Allerdings sollte hierbei beachtet werden, dass keine Beeinträchtigung der notwendigen zellulären Ereignisse stattfindet.

Desweiteren wurden bei der Behandlung transgener Mäuse mit Mikrotubuli-stabilisierenden Medikamenten signifikante Verbesserungen des schnellen axonalen

¹³ Gain-of-Funktion, beziehungsweise die Größe gebildeter Aggregate, korreliert mit Toxizität

Transports und der Mikrotubuli-Dichte, sowie der motorischen Funktionen erzielt [Brunden et al., 2009].

Eine Hochregulierung des Abbaus fehlgefalteter Proteine¹⁴ zu fördern könnte die Mengen pathologischen Taus ebenfalls reduzieren [Brunden et al., 2009].

Auf Grundlage der Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist es ein weiterer Forschungsansatz, die A β -Produktion, Aggregation oder weitere neurotoxische Vorgänge zu verhindern.

Ein Beispiel hierfür stellen die A β -Oligomere als Angriffspunkt dar, welche, im Gegensatz zu Monomeren, toxisch für Neuronen in Zellkultur sind. Die Bildung solcher oligomeren Aggregationskerne, wie sie in der Lag-Phase der A β -Fibrillen-Bildung neben schnellem Fibrillenwachstum stattfindet, könnte z.B. durch γ -Sekretase-Inhibitoren verhindert werden (positive Ergebnisse bei *in-vitro*-Versuchen). Desweiteren könnte es ein Ziel sein, die APP-Expression zu verhindern oder den Abbau von A β zu verstärken. [Wolfe, 2002].

Wünschenswert wäre es, die A β -Aggregation direkt zu blockieren, da die Modulation der Sekretasen andere essenzielle proteolytische Effekte beeinflussen könnte. Notwendig ist hierfür allerdings unter anderem eine Verringerung der Zink-Mengen, da Zink Aggregationen induzieren kann [Wolfe, 2002].

Aufgrund der zusätzlich auftretenden Entzündungsreaktionen bei der AD könnten entzündungshemmende Substanzen eine entscheidende Rolle in der Prävention und Behandlung der AD spielen. So könnten Entzündungsmedikamente den Beginn der AD verzögern oder das Fortschreiten verlangsamen. Eine langfristige Einnahme könnte vor der AD schützen, wobei positive Ergebnisse bereits erzielt wurden. [Wolfe, 2002].

Somit ist es eine Strategie, toxische „Aktionen“ der Mikroglia, wie sie bei der AD auftreten, zu verhindern [McGeer & McGeer, 2006].

Beide erwähnten Proteine sind für die Erforschung möglicher Therapiestrategien gegen die AD von entscheidender Bedeutung. Für Tau-fokussierte Therapieansätze spricht, dass eine nachgewiesene Korrelation zwischen Gedächtnisbeeinträchtigungen und den NFT's besteht. Alle Untersuchungen, welche im Rahmen dieser Arbeit angestellt wurden, beschäftigen sich daher mit potenziell toxischen Formen des Tau-Proteins. In Anlehnung an die bereits nachgewiesene Toxizität der Oligomere des A β soll untersucht werden, ob auch eine besondere Toxizität von den Tau-Oligomeren (im Gegensatz zu Monomeren und Fibrillen) ausgeht.

¹⁴ Proteinabbau: durch Ubiquitin-Proteasom-System (Ubiquitin, welches sich in den meisten intrazellulären Einschlüssen befindet [Nonaka et al., 2010], markiert, Proteasom baut Protein ab) oder Makroautophagie (bei größeren multimeren Strukturen)

1.5 Theoretischer Bezug zu den Versuchen: besondere Eigenschaften und Aggregation des Tau-Proteins

Eine wichtige Eigenschaft des Tau ist seine Hydrophilie [Wang et al., 2010], welche vor allem in einer geringen Aggregationstendenz resultiert. Dies macht es schwieriger, Stadien der Aggregation mit biochemischen und/oder spektroskopischen Methoden zu erforschen [Barghorn & Mandelkow, 2007]. Allerdings kann auch bereits die ungeordnete Form des monomeren Tau-Proteins den Fibrillierungsprozess initiieren [Kovacech et al., 2010].

Bei der Aggregation des Tau-Proteins kommt es zu einer Konformationsänderung [Ding & Johnson, 2008] mit β -Faltblatt-Strukturen, das Protein verliert daher seine natürliche Funktion [Honson & Kuret, 2008].

Das Tau-Protein neigt unter physiologischen Bedingungen¹⁵ nicht zur Aggregation. Dies gilt besonders für das in diesen Versuchen verwendete ht40¹⁶ („humanes Tau 40“, mit 441 Aminosäuren auch als „full-length tau“ bezeichnet), der längsten Isoform [Honson & Kuret, 2008]. Aus diesem Grund wird Heparin zugesetzt, welches neben anderen Substanzen, wie Kongorot [Bandyopadhyay, 2007], oder der Verwendung spezieller Domänen¹⁷ [Barghorn & Mandelkow, 2007], die Aggregation diverser Proteine induzieren und fördern kann. So führten niedermolekulare Farbstoffe, welche die Zellmembran passieren können, in Zellkultur zu Tau-Aggregationen im Cytoplasma [Honson & Kuret, 2008]. *In vitro*-Auslöser von Aggregationen können ebenfalls Phosphorylierung, Proteolyse, Oxidation und die Interaktion mit Polyanionen, sein. Ihre exakte *in vivo*-Wirkung ist nur teilweise bekannt [Friedhoff et al., 1998].

Der Einfluss von aggregations-fördernden Substanzen ist in Abbildung 6 darstellt.

¹⁵ Abgesehen von über 30 Mutationen, welche zu Aggregation (spontane Bildung von Fibrillen) und Neurodegeneration führen können [Honson & Kuret, 2008]

¹⁶ Bei der AD aggregierte Isoform des Tau [Bandyopadhyay, 2007]

¹⁷ Die Mikrotubuli-bindene Domäne aggregiert schneller als ht40 [Yao et al., 2003], Die Mutation P301 verbessert ebenfalls die Neigung zur β -Faltblatt-Struktur und damit zur Aggregation. Wird also nur ein bestimmter Teil des Proteins zur Aggregation gebracht, gelingt dies einfacher und schneller als die Aggregation des gesamten Tau-Proteins.

Die Grundeinheit der PHF's enthält 8-14 Tau-Monomere, die Repeat-Domäne des Tau-Proteins konnte nachgewiesen werden. Diese Repeat-Domäne in der C-Terminalen Hälfte des Tau führt schneller zu PHF's als „full-length“-Isoformen. Desweiteren ist bekannt, dass in den weiter aggregierten NFT's mRNA angereichert ist [Friedhoff et al., 1998].

An Mikrotubuli gebundenes Tau behält die ungeordnete (nicht toxische) Struktur. Oligomere könnten (als unlösliches aggregiertes Tau eher als NFT's nach unserer Vermutung) Neurodegeneration induzieren. In der „prä-Nukleation“-Phase bilden sich metastabile Aggregate, die allerdings auch wieder zerfallen. In der Nukleation haben Aggregate einen großen Anteil an β -Faltblattstruktur [Li et al., 2008].

2 Ziel der Arbeit

Die Aggregation von Protein-Monomeren zu Protein-Filamenten ist in mehreren Krankheiten, so auch der AD, von Bedeutung. So gilt das unkontrollierte Ansammeln dieser Aggregate als Hauptgrund neuronaler Degeneration [Friedhoff et al., 1998].

Ziel dieser Arbeit ist die nähere Charakterisierung des Aggregationsverhaltens des Tau-Proteins in Abhängigkeit von der Aggregationsdauer, sowie die Identifikation toxischer Aggregationsintermediate.

Hierzu werden verschiedene Versuchsansätze gewählt, welche einer kurz-, mittel-, sowie langfristigen Aggregation unterliegen, um die Bildung von Oligomeren¹⁸ (größere, höher geordnete Filamente), sowie Tangle-ähnlichen Filament-Aggregaten¹⁹ [Avila et al., 2006] abhängig von der Zeit zu untersuchen.

Das hitze- und säurestabile²⁰, ungefaltete²¹ [Barghorn & Mandelkow, 2007], monomere²² [Cleveland et al., 1977] Protein, welches vor allem in Axonen vorkommt [Hirokawa et al., 1988], soll *in vitro* zur Aggregation gebracht und deren Verlauf untersucht werden.

Die Fragestellung der Toxizität im Aggregationsverlauf ist aufgrund folgender Tatsachen besonders interessant: bei Triple-transgenen Mäusen sowie *Drosophila* konnten Gedächtnisbeeinträchtigungen bzw. Neurodegeneration ohne NFT's als Endstufe der Aggregation beobachtet werden. Demzufolge können bereits nicht-fibrilläre Tau-Aggregate toxisch und NFT's für eine Ausprägung der AD-Pathologie nicht zwingend notwendig sein. Dies steht

¹⁸ so genannten vor-fibrillären Strukturen [Ding & Johnson, 2008]

¹⁹ welche AD-spezifische Konformationen haben [Kovacech et al., 2010]

²⁰ Generell gilt das Tau-Protein als stabil, auch wegen seiner hohen Schmelztemperatur und Resistenz gegen Proteasen [Sadqi et al., 2002]. Es kann also aufgrund seiner losen Struktur vielen eigentlich schädlichen Einflüssen ausgesetzt sein, ohne direkt seine biologische Funktion zu verlieren [Yao et al., 2003].

²¹ Meist random-coil-Struktur [Barghorn & Mandelkow, 2007]

²² etwa 50nm lang, fünf Polypeptide mit stäbchenförmigen Molekülen umfassend

jedoch im Widerspruch zu der Tatsache, dass die Anzahl der NFT's mit der kognitiven Beeinträchtigung korreliert [Ding & Johnson, 2008].

Somit steht die Idee im Vordergrund, dass in erster Linie Oligomere (also Aggregationsintermediate [Schneider et al., 2010], eher als Fibrillen) relevant für die Neurotoxizität sind [Nonaka et al., 2010].

Hierzu muss das basische Tau-Protein in Bakterien erzeugt und aus deren Lysat aufgereinigt werden.

Das Ausmaß der Tau-Aggregation korreliert im Hirn von Alzheimer-Patienten mit Neurodegeneration und Synapsenverlust. Dies deutet auf eine Verbindung zwischen Bildung von Aggregaten und Toxizität hin [Honson & Kuret, 2008]. Diese Tau-Aggregation ist ein zentraler Bestandteil der AD-Pathogenese und daraus resultierend die Grundlage der durchgeführten Experimente.

Generell könnte eine Beeinflussung der Fibrillenbildung von zentraler Bedeutung für Tau-basierte Therapiestrategien der AD sein [Bandyopadhyay, 2007]. Die Tau-Protein-Aggregation wird in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

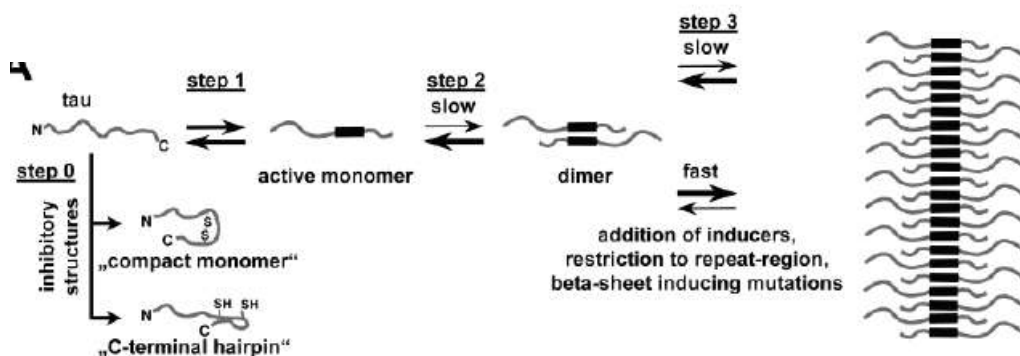


Abbildung 7: Schema der Aggregation des Tau-Proteins.

Teile der repeat-Domänen haben ausgedehnte Konformationen, was β -Faltblatt-Interaktionen mit anderen Molekülen möglich macht: Tau-Moleküle bilden Dimere, und durch weitere Mono- und Dimere entsteht ein Filament. Ist Tau nicht in der passenden Konformation, kann es keine Aggregate bilden, inhibiert diese vielleicht sogar. Bei normalem löslichem Tau ist das Gleichgewicht auf der Seite der Monomere [Barghorn & Mandelkow, 2007]

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Molekulargewichtsmarker, Plasmide

In den folgenden Tabellen enthalten die verwendeten Chemikalien, Plasmide, Antikörper, Enzyme sowie Molekulargewichtsmarker zusammen mit den dazugehörigen Bezugsquellen.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Hersteller/ Bezugsquelle	Chemikalie(n)
Apolda Chemie	Salzsäure
Biochrom-KG	DMEM/HAM's 12 (Zellkulturmedium), FKS, L-Glutamat, NEAA
Biolabs	APS, Luminol- und Wasserstoffperoxid-Lösung für die Visualisierung von Proteinen an der PVDF-Membran
Biomol	MES
Ferak	APS, Triton X-100
J.T. Baker	HCl
Lachema	NaOH
Merck	D-Glucose, KCl, Na ₂ CO ₃ , NaHCO ₃ , Wasserstoffperoxid (30%) (v/v)
Millipore	Reinstwasser (Aqua dest. gereinigt über Millipore-Analge)
Roche	Complete (Protease Inhibitor Cocktail Tabs)
Roth	Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel-30: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid), Agar (Agar-Agar), Ammoniumsulfat, Ampicillin, DTT, EDTA, Essigsäure (100%), Ethanol, Glycin, Hefeextrakt, HEPES, IPTG, Methanol, NaCl, Pepton, SDS, TEMED, Tris
Serva	BSA (Albumine bovine fraction V), Coomassie-Brilliantblau R-250, PMSF
Sigma-Aldrich	AEBSF, ANS, β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Chloramphenicol, DMSO, Heparin, Kaltwasserfischgelatine, Magnesiumchlorid, MOPS,

	MTT, Natriumacetat, OPD, Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin mit 0,9 % (w/v) NaCl), Thioflavin-S, Tween- 20
Whatman	DEAE-Cellulose, Phosphocellulose
VEB	Glycerol

Das verwendete Plasmid prk172-ht40 wurde ursprünglich von Michel Goedert (Division of Neurobiology, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England) zur Verfügung gestellt und seither mittels Plasmid-Präparation vervielfältigt. Es codiert für die längste humane Isoform des wt-Tau-Proteins, sowie eine Ampicillinresistenz.

Die Zelllinie SH-SY5Y wurde über die DSMZ GmbH bezogen.

Tabelle 2: verwendete Antikörper, Enzyme, Kits, Molekulargewichtsmarker

Antikörper	
<i>ELISA-Fangantikörper</i>	invitrogen
Rabbit pAb Anti-Oligomer Antibody (A11) Cat AHB0052 50µg/50µl, Lot 420597B; 1:2000	
<i>Primärantikörper</i>	
MAB 3420 CA92590, MSX Tau-1, Lot 0604027025, QTY 100µg (1mg/ml) 1:4000	Temecula
Kaninchen anti-Tau A0024, 1:2000	Dako
<i>Sekundärantikörper</i>	
ECL anti-Maus Ig, horseradish peroxidase linked whole antibody (from sheep) GPR, Lot 385991; NXA931 1:4000	GE Healthcare
Maus anti-APP Mab 348, 1:2000	Chemicon
Kits	
Cytotoxicity-Detection-Kit (LDH-Assay)	Roche
Enzyme	
Benzonase® Nuclease HC	Novagen
Lysozym (aus Hühnerei)	Serva
Molekulargewichtsmarker	
Proteinstandard Prestained Protein Marker (6-175 kDa)	New England Biolabs

3.1.2 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software

Verwendete Geräte, sowie Verbrauchsmaterialien sind, einschließlich Hersteller, in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 3: Verwendete Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software

Hersteller	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software
Adobe	Bildbearbeitung Photoshop CS2
Amersham Biosciences	Gene Quant pro
Amicon	Microzentrifuge MC-13
Berthold Technologies	Miltras LB 940 (Mikroplatten-Photometer)
Binder	CO ₂ -Inkubator CB210
Biostep	Elektrophoresekammer, Western blot-Zelle TV400-EBK, DNR Bio-Imaging Systems MF- ChemBIS 1.6
Brugwedel	Wärmebad GFL
Dynex Technologies	MKX ELISA-Mikrotiterplatten-Reader
Eppendorf	Thermomixer Compact
GE Healthcare	ÄKTAprime plus HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S300 HR HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S500 HR
H + P Labortechnik AG	Dampfsterilisator Autoklav
Heraeus Instruments	HeraSafe Hs12 Werkbank Multizentrifuge 3L-R
IKA Labortechnik	Magnetrührer mit Heizung RCT basic
Major science	Stromversorgung MP300V
Millipore	Amicon Stirred Ultrafiltration Cell Model 8010
MLW	Schüttler Thys 2
New Brunswick Scientific Edison	Innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker
Panasonic	Mikrowelle NN T251W
Perkin Elmer	PVDF-Membran
Schott	pH-Meter Lg-842
Scientific Industries (Si)	Vortexer
Serva	Dialyseschlauch Ausschlussgröße 12-14 kDa
Siemens	Wasserkocher WK9

Sigma	Zentrifuge 3-30K
Sovall	Combi Plus Ultrazentrifuge
VEB	Brutschrank Typ 11
Whatman	Filterpapier (Western Blot)
Virtis	VirSonic Cell Disrupter 16-850 Ultraschallgerät

3.1.3 Medien, Lösungen, Puffer

Die folgende Tabelle enthält alle verwendeten Medien, Puffer, sowie Lösungen mit ihren jeweiligen Zusammensetzungen. Puffer für die Gelfiltration wurden mit sterilfiltriertem Wasser hergestellt und anschließend noch einmal sterilfiltriert. Bei allen anderen Anwendungen wurde aqua dest. verwendet. Medium zur Expression wurde vor dem Versuch entsprechend autoklaviert.

Tabelle 4: verwendete Medien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert
LB- Medium	1,0 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 85,5 mM NaCl	
LB- Agar	1,7% (w/v) Agar auf LB-Medium Ampicillin (Endkonzentration 100µg/ml) Chloramphenicol (Endkonzentration 30µg/ml)	7,0
SOB- Medium	2,0 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM Kaliumchlorid	
SOC- Medium	37 mM Glucose 10 mM Magnesiumchlorid auf SOB-Medium	7,0

Tabelle 4 (Fortsetzung): verwendete Medien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert
2x YT- Medium	1,6 % (w/v) Pepton 1,0 % (w/v) Hefeextrakt 85,5 mM NaCl	7,0
PBS (steril)	2,7 mM Kaliumchlorid 1,47 mM Natriumdihydrogenphosphat 8,06 mM Dinatriumhydrogenphosphat 137 mM NaCl	7,4
Coomassie- Brilliantblau G-250-Färbelösung	0,1 % Coomassie-Brilliantblau R-250 in Entfärber I	
Dialysepuffer	5 mM MOPS 0,1 mM EDTA 0,1 mM PMSF	7,0
Entfärber I	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure	
Entfärber II	10 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Essigsäure	
Blocker- Lösung	1% (w/v) BSA in TBS-T	
Blot-Puffer	48 mM Tris 39 mM Glyzin 6,25 M Methanol 0,14 mM SDS	
Lysepuffer	50 mM Tris 5 mM EDTA <i>direkt vor Verwendung hinzugeben:</i> 0,1 mM DDT 1 mM PMSF	7,4

Tabelle 4 (Fortsetzung): verwendete Medien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert
Polyacrylamid- Sammelgel (4% mit SDS)	125 mM Tris Acrylamid-Lösung (Endkonzentration 4% (v/v) Acrylamid) 3,5 mM SDS 8,8 mM APS 13,25 mM TEMED	6,8
Polyacrylamid- Trenngel (8- oder 10%ig mit SDS)	375 mM Tris Acrylamid-Lösung (Endkonzentration 8- bzw. 10 % (v/v) Acrylamid) 3,1 mM SDS 4,4 mM APS 13,25 mM TEMED	8,8
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % SDS	
SDS- Probenpuffer (2x)	125 mM Tris 20 % (v/v) Glycerol 4 % (w/v) SDS 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol Krümel Bromphenolblau	6,8
TBS (1x)	10 mM Tris 150 mM NaCl	7,4
TBS-T	TBS mit 0,05% Tween 20	
Carbonat- Puffer	Lösung 1: 0,1 M NaHCO_3 Lösung 2: 0,1 M Na_2CO_3 Lösung 1 vorlegen und mit Lösung 2 bis pH = 9,6 einstellen	
Acetat- Puffer	0,1 M Natriumacetat auf pH= 5,0 mit Essigsäure (100%)	5,0

Tabelle 4 (Fortsetzung): verwendete Medien, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH-Wert
NaPO ₄ -Puffer für Proteinbestimmung	Lösung 1: 100 mM Na ₂ HPO ₄ Lösung 2: 100 mM NaH ₂ PO ₄ * 2 H ₂ O Lösung 1 vorlegen und mit Lösung 2 pH einstellen	8,0
OPD- Substratlösung für ELISA	4 mM ortho-Phenyldiamin 0,025 % (v/v) H ₂ O ₂ 0,1 M Acetatpuffer	
Blockierlösung ELISA	0,5% (w/v) Kaltwasserfischgelatine in TBS-T	
MES- Gelfiltrationspuffer	50 mM MES 50 mM NaCl 0,1 mM EDTA <i>direkt vor Verwendung dazugeben:</i> 0,1 mM DTT 1 mM PMSF	6,5
MOPS-Gelfiltrationspuffer	50 mM MOPS 50 mM NaCl 0,1 mM EDTA	
MOPS- Aggregationspuffer	20x MOPS- Gelfiltrationspuffer	
SH-SY5Y-Medium	Dulbecco's Modifies Eagle's Medium/Nährstoffmischung F-12 (DMEM/HAM's F-12 (1:1)) 15 % (v/v) FKS 1 % (v/v) L-Glutamat (200 mM) 1 % (v/v) NEAA 1 % (v/v) einer 100 µg/µl Penicillin- Streptomycin-Lösung	
Sörensen- Puffer	100 mM Glyzin 100 mM Natriumchlorid	10,5
MTT- Lösung	5 mg MTT in 1 ml PBS steril filtriert	

3.2 Methoden

3.2.1 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen BL21 mit dem Plasmid prk172-ht40

Für die Transformation wurden jeweils 100 µl kompetente BL21-Codon-Plus(DE3)RIL-Zellen, welche bei -80 °C gelagert wurden, mit 320 ng Plasmid²³ versetzt, vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 sec bei 42 °C im Wasserbad wurden die Ansätze erneut drei min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 400 µl warmes SOC-Medium hinzugegeben und für 60 min bei 37 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Jeder Ansatz wurde gleichmäßig auf zwei LB/Ampicillin+Chloramphenicol-Agarplatten ausgestrichen und die Kolonien ü.N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 Expression des Tau-Proteins in transformierten BL21-Zellen

Für die Expression des rekombinanten humanen Tau-Proteins (ht40= 2N4R Tau-Isoform) wurden alle auf den LB/Ampicillin+Chloramphenicol-Agarplatten gewachsenen Kolonien abgespült und gleichmäßig (je eine bewachsene Agarplatte pro l) auf entsprechende Kolben aufgeteilt, in denen sich je 1 l 2xYT-Medium mit 100 mg/l Ampicillin befand.

Die Ansätze wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 bei 37 °C und 100 rpm inkubiert und anschließend 0,5 mM IPTG zu jedem Ansatz hinzugegeben, um die Proteinexpression zu induzieren. Nach erneuter Inkubation von 2,5 h wurden die Ansätze 15 min bei 4000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Lyse bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Zellaufschluss

Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet aus 5 l Bakterienkultur in 50 ml (gekühltem) Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurde Lysozym mit einer Endkonzentration von 18500 U/ml hinzugegeben und durch eine Ultraschallbehandlung auf Eis die Zellen in der Suspension lysiert. Zur Verbesserung der Lyse wurden sowohl 1% (v/v) Triton-X-100, als auch Benzonase, mit einer Endkonzentration von 4 U/ml hinzugegeben. Die Suspension wurde 60 min, leicht rotierend, bei 4 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 4°C und 30000g zentrifugiert. Das Tau-Protein befand sich nun im Überstand. Um eventuelle

²³ Verwendetes Plasmid: PRK172-ht40, codiert für „humanes Tau 40“ – mit 441 Aminosäuren die längste Tau-Isoform (2N4R-Isoform), sowie eine β-Lactamase, die Ampicillin-Resistenz vermittelt

Verluste zu verhindern, wurde das Pellet erneut mit 10 ml Lysepuffer reextrahiert, 20 min bei 4 °C schwenkend inkubiert und anschließend 30 min bei 4 °C und 30000g zentrifugiert. Aus beiden Überständen wurde eine Probe von 10 µl mit 90 µl Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C und 650 rpm erhitzt und für eine spätere SDS-PAGE aufbewahrt. Die beiden Überstände wurden vereinigt und bis zur Aufreinigung bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.4 Aufreinigung des Tau-Proteins mit Hilfe DEAE- und Phosphocellulose

Die Reinigung des humanen Tau-Proteins erfolgte über Ionenaustauschchromatographie, bei der dessen basischer Charakter ausgenutzt wurde.

Hierbei wurde zunächst eine Reinigung mit Hilfe der DEAE-Cellulose (Anionenaustauscher) durchgeführt, welche dazu dient, einen Großteil der sauren und neutralen *E.coli*- Proteine von dem Tau-Protein abzutrennen.

Für diesen ersten Schritt der Protein-Aufreinigung muss die DEAE-Cellulose im Lysepuffer equilibriert werden. Dazu wurden 50 ml DEAE-Cellulose in ein Reaktionsgefäß überführt und fünf min bei 4 °C und 5000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Volumen des Überstandes mit Lysepuffer aufgefüllt, gemischt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis der Ethanol, in dem die Cellulose gelagert wurde, ausgewaschen war. Anschließend wurde der Zellaufschluss-Protein-Überstand hinzugegeben und beides nach gründlicher Durchmischung eine Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von zehn min bei 4°C und 5000xg wurde der Überstand erneut in ein Reaktionsgefäß mit equilibrierter DEAE-Cellulose überführt und ein zweites Mal inkubiert und zentrifugiert.

Vom filtrierten Überstand wurden 20 µl entnommen, mit 100 µl Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt und bis zur SDS-PAGE bei 4 °C aufbewahrt.

Im zweiten Reinigungsschritt wurde die Phosphocellulose als Kationenaustauscher verwendet. Hierfür wurden 100 ml Phosphocellulose (1:1 in 100 mM Phosphatpuffer pH 6,85 mit 0,05 % (w/v) Natriumazid) in ein Becherglas überführt. Nach Absetzen der Phosphocellulose wurde der Überstand verworfen und die Cellulose mit 50 ml Lysepuffer gemischt. Die Phosphocellulose wurde erneut mit Lysepuffer gewaschen und danach in eine Chromatographie-Säule überführt. Als der Lysepuffer die Säule passiert hatte, wurde erneut mit 50 ml Lysepuffer gespült. Jetzt konnte der Überstand des DEAE-Reinigungsschrittes auf die Säule gegeben werden. Von dem Durchfluss wurde eine Probe von 20 µl mit 100 µl Probenpuffer versetzt, fünf min bei 95 °C erhitzt und bis zur SDS-PAGE bei 4 °C aufbewahrt. Bei dem Kationenaustausch bindet das Tau-Protein an die

Matrix und muss anschließend eluiert werden. Durch Elution mit NaCl lässt sich das Tau-Protein von der Phosphocellulose „lösen“ [Cleveland et al., 1977]. War das gesamte Volumen des Überstandes durchgetropft, wurden nacheinander jeweils 15 ml 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, fünfmal 0,5 M, sowie zweimal 0,8 M NaCl auf die Säule gegeben und die Durchflüsse getrennt zu je 7,5 ml aufgefangen. Von jeder Fraktion wurde eine Probe von 5 µl mit 100 µl Probenpuffer versetzt, fünf min bei 95 °C erhitzt.

Anschließend wurden alle Proben auf ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Coomassie-Färbung auf ihren Protein-Gehalt untersucht. Die Fraktionen mit dem meisten Tau- Protein, aber geringer Verunreinigung, wurden zur sich anschließenden Proteinfällung vereinigt, die restlichen verworfen.

3.2.5 Ammoniumsulfat- und Hitzefällung des Tau-Proteins

Die Hitzestabilität des Tau-Proteins macht eine Hitzefällung möglich, durch die noch in der Lösung vorhandene Proteine entfernt werden können [Cleveland et al., 1977]. Diese wurde wie folgt durchgeführt: Zur Fällung des Tau-Proteins wurden die nach der Aufreinigung vereinigten Fraktionen mit Ammoniumsulfat versetzt, sodass eine 50% gesättigte Lösung (313 g/100 ml bei 25 °C) entstand. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde eine Zentrifugation bei 4 °C und 100000xg für 30 min durchgeführt. Das entstandene Pellet wurde in 1,5 ml MES-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1:100 Complete Protease Inhibitor und 0,5 % Mercaptoethanol (Endkonzentration) wurde die Proteinlösung für zehn min bei 100 °C erhitzt. Eine Zentrifugation für zehn min bei 4 °C und 10000xg ließ bei dem Kochen ausgefallene Proteine pelletieren. Der Überstand mit dem Tau-Protein wurde anschließend für die Gelfiltration verwendet.

3.2.6 Gelfiltration und anschließende Aufkonzentrierung des gefällten Tau-Proteins

Die Gelfiltration wurde mit einer Sephacryl S300-Säule durchgeführt. Als Puffer diente der Gelfiltrations-(MES-)Puffer. Hierfür wurde das gefällte Tau-Protein erneut 10 min bei 10000g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer Spritze in den 5 ml-FPLC-Loop injiziert. Das Equilibrierungsvolumen betrug 10 ml, das Load-Volumen ebenfalls 10 ml und das Elutionsvolumen 180 ml, bei einer Flussrate von 0,5ml/min. Dabei wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt, wobei das Programm PrimeView Erkenntnisse darüber lieferte, in welchen Fraktionen das Tau-Protein zu erwarten ist. Hierbei misst die

FPLC die Extinktion bei 280 nm nach der Säule und ermittelt daraus resultierend die Konzentration (unter anderem) der Proteine. Aus den entsprechenden Fraktionen wurden jeweils 20 µl Probe entnommen und mit 20 µl Probenpuffer versetzt, fünf min bei 95 °C erhitzt und anschließend nach elektrophoretischer Auftrennung auf ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Mit Hilfe der Coomassie-Färbung konnte ermittelt werden, in welchen Fraktionen sich das Tau-Protein befindet (mit möglichst wenigen Verunreinigungen). Diese entsprechenden Fraktionen wurden vereint. Anschließend wurde mit Hilfe einer Ultrafiltrationskammer das Tau-Protein aufkonzentriert, das Volumen verringerte sich hierbei etwa auf ein Fünftel. Das aufkonzentrierte Tau wurde bis zur Dialyse in Eis oder bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.7 Dialyse des aufkonzentrierten Tau-Proteins

Die sich anschließende Dialyse diente dazu, das Tau-Protein von Salzen und niedermolekularen Stoffen zu reinigen. Hierfür wurde das aufkonzentrierte Tau in einen Dialyseschlauch überführt, welcher zuvor in Dialysepuffer kurz inkubiert wurde. Das Tau-Protein wurde anschließend in 3 l Dialysepuffer ü.N. dialysiert. Die Ausschlussgröße des Dialyseschlauches betrug hierbei 12-14 kDa. Nach der Dialyse wurde zur etwaigen Konzentrationsbestimmung eine Messung der optischen Dichte bei 280 nm durchgeführt. Die Lagerung des Tau-Proteins erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff.

3.2.8 Herstellung verschiedener Aggregationsansätze und anschließende Gelfiltration

Um das Tau-Protein zum Aggregieren zu bringen, wurde das aufkonzentrierte Tau in Aggregationspuffer (Endkonzentration 1x) mit 0,3 mg Heparin /ml Aggregationsansatz und 1 mM AEBSF versetzt und im Brutschrank inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (24 h, 72 h, sowie 120 h nach Ansetzen) wurden 500 µl entnommen und w.o. in die FPLC (allerdings in einen 2 ml- Loop) injiziert. Als Kontrollansatz wurde ein Ansatz ohne Heparin (Heparin-Volumen wurde ersetzt durch Aqua dest.), als 0h Aggregation mit einbezogen. Es wurde jeweils eine Sephacryl S500- Gelfiltration durchgeführt, bei der als Puffer der MOPS-Aggregationspuffer diente. Das Equilibrierungsvolumen betrug 10ml, das Injektionsvolumen 2 ml und das Elutionsvolumen 180 ml. Es wurden ebenfalls Fraktionen von 2 ml gesammelt. Mit Hilfe des Programmes PrimeView wurde erneut die

280_{nm}-Extinktion beobachtet, aus relevanten Fraktionen 20 µl Probe entnommen, mit 10 µl Probenpuffer versetzt, 4 min bei 80 °C erhitzt und auf ein 8 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Alle relevanten Proben (Fraktionen, welche Filamente, Oligomere und Tau als Monomer enthalten sowie die dazwischen gelegenen) wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.9 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Um die Protein-Proben elektrophoretisch aufzutrennen und damit analysieren zu können, wurde jeweils ein 8- oder 10 %iges Trenngel gegossen, welches mit Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Auspolymerisation des Gels wurde das Isopropanol abgegossen, ein 4 %iges Sammelgel daraufgegossen und ein entsprechender Probenkamm (mit 24 oder 36 Taschen) sofort hineingesteckt. War das Sammelgel auspolymerisiert, wurde der Kamm herausgezogen, das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Nach Ausspülen der Taschen mit 1xSDS-Laufpuffer wurden die Proben (zu 10 µl) aufgetragen. Zur Orientierung wurde ein Proteinstandard aufgetragen, welcher bestimmte mit Farbstoff markierte Proteine enthält. Als Spannung wurde zunächst 150 V gewählt, welche beim Einlaufen der Proben in das Trenngel auf 200 V erhöht wurde. Zur Visualisierung der Proteine wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt.

Für diese Coomassie-Färbung wurde das Gel ca. zehn min in Coomassie-Brilliantblau G250-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Zur besseren Anfärbung wurde das Gel mit der Färbelösung zu Beginn für eine min bei 600 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Zur Entfärbung der nicht-Protein-spezifisch gefärbten Anteile wurde das Gel ca. eine min in Entfärber I und anschließend bis zum Entfärben des Gels (und daraus resultierendem Sichtbarwerden der Proteinbanden) in Entfärber II schüttelnd inkubiert. Um die Entfärbung zu verbessern, wurde das Gel im Entfärber II ebenfalls für eine min bei 600 Watt erhitzt und die Entfärbelösung regelmäßig gewechselt.

3.2.10 Western-Blot- Verfahren und Immunfärbung des Tau-Proteins auf der PVDF-Membran

Zur Untersuchung der Stabilität des Tau-Proteins wurde ein Western-Blot - anstelle der Coomassie-Färbung - durchgeführt. Hierfür wurde zunächst mit ausgewählten Fraktionen, nach Lagerung für drei Wochen bei -80 °C und für zwei Wochen bei 4 °C, ein MTT-Assay

durchgeführt und die Reaktionsprodukte (bzw. die darin enthaltenen Proteine) mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

Anschließend wurde eine auf die Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran für eine min in Methanol und anschließend mit entsprechend gleich großen Filterpapieren für zehn min in Blot-Puffer inkubiert. Die Blotkammer wurde wie folgt beschichtet:

Anode (-)	Filterpapier
	SDS-Polyacrylamid-Gel mit aufgetrennten Proteinen
	PVDF-Membran
Kathode (+)	Filterpapier

Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte hierbei ü.N. bei 120 mA und ca. 30 V. Nach einem Waschschrift in TBS-T für zehn min wurde die PVDF-Membran bei RT für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert, um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Die Inkubation der Membran im Primärantikörper (Kaninchen anti-Tau Dako 1:2000) erfolgte für eine Stunde unter leichten Schwenken. Nach dreimaligem, fünfminütigem Waschen in TBS-T wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (HRP-konjugierter anti-Kaninchen Antikörper) in Verbindung gebracht und für ebenfalls eine Stunde bei RT und leichtem Schwenken inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x zehn min in TBS-T) folgte die Visualisierung der auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine. Dies geschah mittels ECL-Methode (aus dem engl.: enhanced Chemiluminescence), bei der Luminol- und Wasserstoffperoxid-Lösungen gemischt werden und für eine min im Dunkeln auf die Membran einwirken müssen. Das entstehende Chemilumineszenz-Signal wurde unter der Dunkelhaube mit einer sensitiven Kamera aufgenommen.

3.2.11 Thioflavin S- und ANS-Assay

Die Assays der beiden Farbstoffe Thioflavin S und ANS dienen der Quantifizierung der Tau-Protein-Aggregation. Thioflavin S bindet an β -Faltblattstrukturen, wobei sich die Quantenausbeute dieses Fluoreszenzfarbstoffes erhöht. ANS bindet an hydrophobe Proteinbereiche (wie auch β -Faltblattstrukturen) und erzeugt danach ein höheres Fluoreszenzsignal. Beide Farbstoffe erkennen also in erster Linie aggregierte Formen des Tau-Proteins. Um die Proben-Farbstoff-Ansätze auf Fluoreszenz zu untersuchen, wurden die benötigten Reagenzien für jede Probe in Wells einer schwarzen 96-Well-

Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend für fünf min inkubiert. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt und als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Aggregations-Probe, welcher stattdessen MOPS-Aggregationspuffer enthielt.

Die Ansätze wurden folgendermaßen gewählt: auf 95 µl Aggregationsansatz wurden jeweils 20 µl Farbstoff (Thioflavin: 100 µM und ANS 20 µM) gegeben, was für Thioflavin in einer Konzentration von ca. 3,5 µM und für ANS von ca. 17 µM resultierte.

Die Farbstoffe entstammten hierbei jeweils aus Stammlösungen, Thioflavin S aus einer 100 mM Lösung in DMSO, sowie ANS aus einer 10 mM in A.d., welche in MOPS-Puffer auf ihre verwendete Konzentration verdünnt wurden.

Die Fluoreszenzmessung wurde für Thioflavin mit einer Lampenenergie von 5000 und für ANS von 7000 durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug bei Thioflavin 430 nm, bei ANS 355 nm und die Emissionswellenlänge bei Thioflavin 535 nm und bei ANS 480 nm.

3.2.12 Protein-Konzentrations-Bestimmung mit Fluorescamin

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine musste zunächst eine Rinderserumalbumin-Eichkurve angefertigt werden. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen an BSA (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,53 µg/ml, 7,81 µg/ml, 3,9 µg/ml, 1,95 µg/ml, 0,97 µg/ml) zu 20 µl zusammen mit 20 µl 100 mM NaPO₄-Pufferlösung und 50 µl des 1,08 M in Aceton gelösten Fluorescamin (Endkonzentration ca. 0,36 M) in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und die entstehende Fluoreszenz bei einer Lampenenergie von 5000, einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm gemessen. Diese Fluoreszenzintensitäten wurden, abhängig von der Konzentration des eingesetzten BSA, in ein Diagramm übertragen und die Geradengleichung bestimmt. Diese Gleichung war die Basis für die sich anschließende Proteinbestimmung. Für Diese wurde, analog zur BSA-Kurve, jeweils 80 µl der einzelnen Gelfiltrationsfraktionen mit Pufferlösung und Fluorescamin in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und die Fluoreszenz gemessen. Mit Hilfe der selbst erstellten BSA-Eichkurve, bei der eine bestimmte Proteinkonzentration vorgelegt und die Fluoreszenz gemessen wurde, konnte von der gemessenen Fluoreszenz auf die Proteinkonzentration geschlossen werden.

3.2.13 Oligomer-ELISA

Es wurde überdies ein Oligomer-ELISA durchgeführt, bei dem zunächst eine 96-Well Mikrotiterplatte mit einem Fang-Antikörper (Kaninchen pAb Anti-Oligomer Antibody, Invitrogen) zu 50 µl beschichtet und ü.N. bei 4 °C schüttelnd inkubiert wurde.

Anschließend wurde kurz mit 100µl TBS-T gewaschen und daraufhin mit 100 µl 1% Kaltwasserfischgelatine für 45 min geblockt. Nach erneutem Waschen wurden ausgewählte Fraktionen des 24h-Aggregationsansatzes, 1:5 in TBS-T verdünnt, aufgetragen und die Platte für 1 h inkubiert. Nach Entfernung der Proben wurde der Primärantikörper (Tau-1) für 1 h, sowie anschließend der Sekundärantikörper (ECL anti-Maus HRP) für 45 min aufgetragen. Nach 10-minütiger Inkubation mit Substrat (7,6 mg OPD/ 20 ml Acetatpuffer + 3,5 µl H₂O₂) wurde die Reaktion mit 9 %iger HCl gestoppt und eine Fluoreszenzmessung bei 450 nm durchgeführt.

Dieser ELISA wurde sowohl mit einem 24h-Aggregationsansatz durchgeführt, welcher bei 4 °C gelagert wurde, als auch mit einem, welcher sofort nach der Auftrennung bei -80 °C eingefroren und gelagert wurde. Hierbei sollte festgestellt werden, ob das Einfrieren den Oligomeren schadet, oder ob diese stabil sind.

3.2.14 LDH- und MTT zur Untersuchung der in-vitro-Toxizität der gesammelten Tau-Fraktionen

In Vorbereitung auf die Toxizitätstests wurden adhärente SY5Y-Zellen in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ü.N. kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und pro Kavität 80 µl ausgewählter Gelfiltrationsansätze zusammen mit 20 µl 5xDMEM/F12-Medium, sowie 2 µl FKS auf die Zellen gegeben und für ca. 24 h bei 37 °C inkubiert.

Für den LDH- Assay wurden 25 µl des Mediums abgenommen und in eine neue 96-Well-Platte überführt. Es erfolgte die Zugabe von 25 µl PBS, sowie 50 µl LDH-Reagenz (100 µl Catalyst-Lösung + 4,5 ml Dye-Solution-Lösung, frisch hergestellt aus dem Cytotoxicity-Detection-Kit der Firma Roche). Nach einer halbstündigen Inkubationszeit im Dunkeln erfolgte die Auswertung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 492 nm.

Der MTT-Test zur Untersuchung auf Vitalität der Zellen erfolgte direkt in der Kultivierungsplatte. Hierfür wurden 10 µl MTT-Lösung in die Kavitäten der Kultivierungsplatte gegeben und dieser Ansatz unter ständiger Beobachtung 30 min - drei h inkubiert. Die mitochondrialen Dehydrogenasen reduzieren das gelbe Tetrazol (MTT) in unlösliche, violette Formazankristalle. War die Reaktion weit genug vorangeschritten,

wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mit Hilfe von 200 µl DMSO und 25 µl Sörensenpuffer je Kavität lysiert. Die Messung der Farbstoffbildung erfolgte bei einer Wellenlänge von 550 nm.

Als Kontrollen dienten in beiden Versuchen SY5Y-Zellen, welche für eine h mit 1% Triton X-100 inkubiert und damit vollständig lysiert wurden (maximale LDH-Aktivität und damit Positivkontrolle, Negativkontrolle bei dem MTT-Test). Desweiteren wurden unbehandelte Zellen (ohne Gelfiltrations-Ansatz) mitgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung verschiedener Tau- Aggregationsansätze mittels Größenausschlusschromatographie

Aufgrund der zweimaligen Durchführung der Aggregation mit anschließender Auftrennung der Fraktionen und verschiedener Ergebnisse wurde sich an dieser Stelle auf die Ergebnisse des ersten Durchganges fokussiert.

In Abbildung 8 ist der Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des unaggregierten Tau-Proteins dargestellt. Der deutlich erkennbare Peak bei den Fraktionen 45-50 zeigt das Monomer, welches hier vertreten ist. Die kleine Erhebung bei den Fraktionen 18/19, welche die Proteine zeigt, die im Säulenausschlussvolumen vorhanden sind, also mögliche Tau-Filamente, ist an dieser Stelle vernachlässigbar. Es ist also, wie erwartet, kein aggregiertes Protein vorhanden.

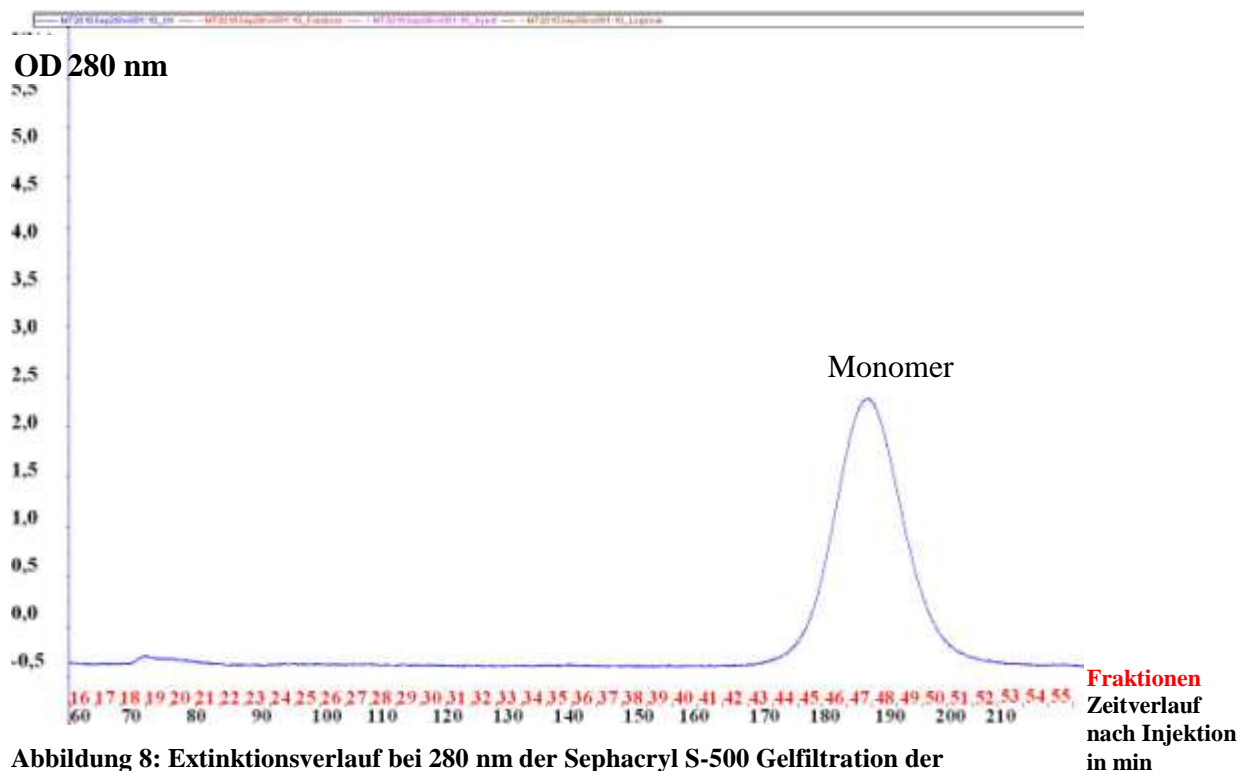


Abbildung 8: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration der 0h-Aggregation

In der Abbildung 9 ist das SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie R250 Färbung dargestellt, auf welches ausgewählte Proben der FPLC-Fraktionen des unaggregierten Tau-Proteins aufgetragen wurden. Hierbei ist deutlich erkennbar, dass nur in den Fraktionen, bei denen die FPLC-Kurve einen Peak zeigt, das Tau-Protein zu verzeichnen ist. Dieses ist bei SDS-Polyacrylamidgelen nach entsprechender Färbung bei 70 kDa zu erkennen.

17 18 19 20 21 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 M



Abbildung 9: 8% iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, 17 – 52: ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 0h-Aggregationsansatzes, M: Proteinstandard

In Abbildung 10 ist der Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 24h-Aggregationsansatzes dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass der Monomerpeak deutlich kleiner ist als bei dem unaggregierten Tau-Protein. Allerdings kommt es hierbei zu einem deutlichen Oligomerpeak (Fraktionen 31 – 38) und einem kleinen Filamentpeak (Fraktionen 19-21). Die Aggregation ist demzufolge gelungen und wird mit längeren Zeiträumen genauer untersucht.

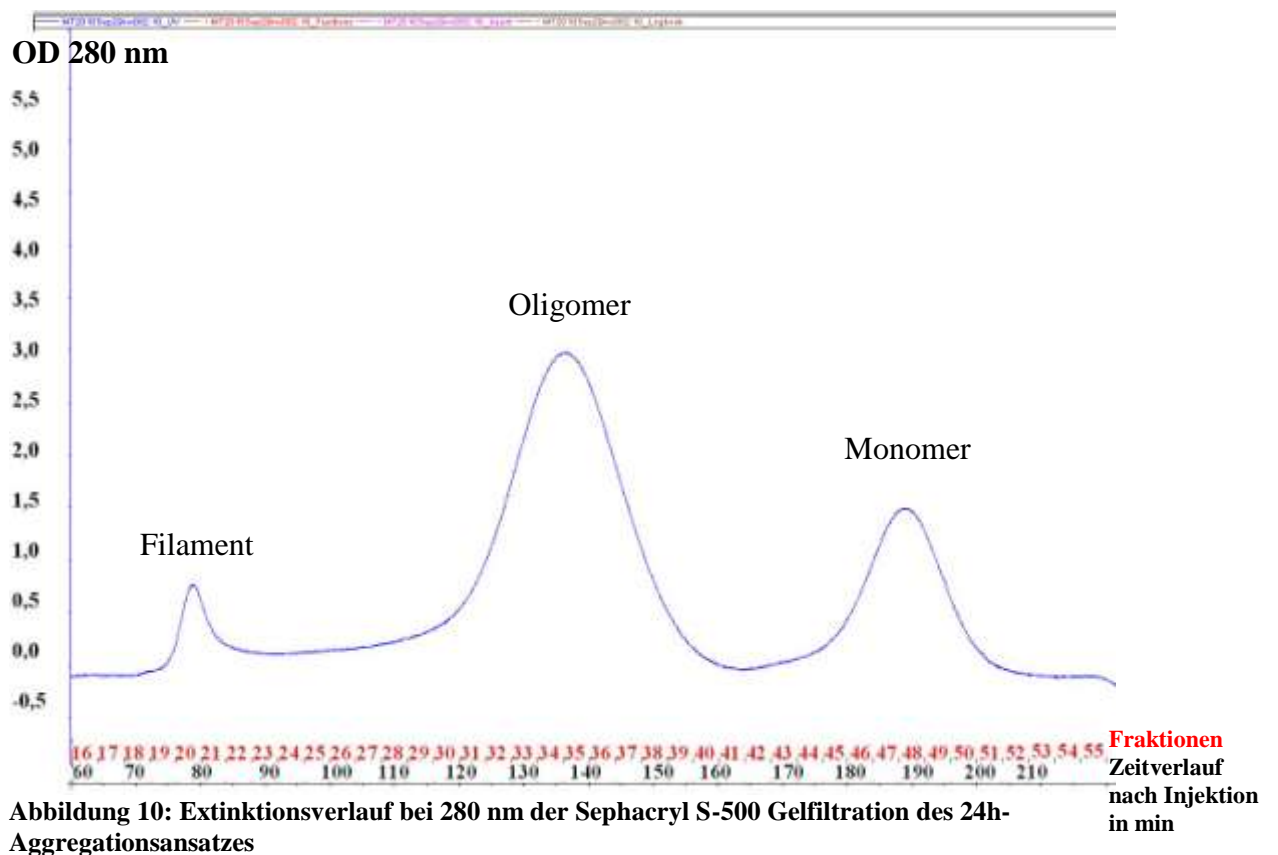


Abbildung 10: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 24h-Aggregationsansatzes

Abbildung 11 stellt das zu dem 24h-Aggregationsansatz gehörige SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie R250 Färbung dar. Schwache Banden sind bei den Filament-Fraktionen zu verzeichnen, bei den Oligomerfraktionen hingegen zeigen sich deutliche Tau-Protein-Banden, einschließlich eines Schmier („Oligomerschmier“, siehe Pfeil), was die Aggregation verdeutlicht. Die Banden in den Monomer-Fraktionen sind ebenfalls noch deutlich zu erkennen.



Abbildung 11: 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, 18 – 52: ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 24h-Aggregationsansatzes, M: Proteinstandard, Pfeil: Oligomerschmier

Abbildung 12 zeigt den Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 72h-Aggregationsansatzes. Hier ist bereits ein sehr deutlicher Filamentpeak (Fraktionen 19-21) zu erkennen, ein breit gezogener (siehe Pfeil) Oligomerpeak (Fraktionen 26 – 38), sowie ein vernachlässigbarer Monomerpeak. Die Verbreiterung des Oligomerpeaks deutet darauf hin, dass ein gewisser Teil der Oligomere zum Zeitpunkt der Chromatographie dabei waren, weiter zu Filamenten zu aggregieren und demzufolge „größere Oligomere“ darstellen.

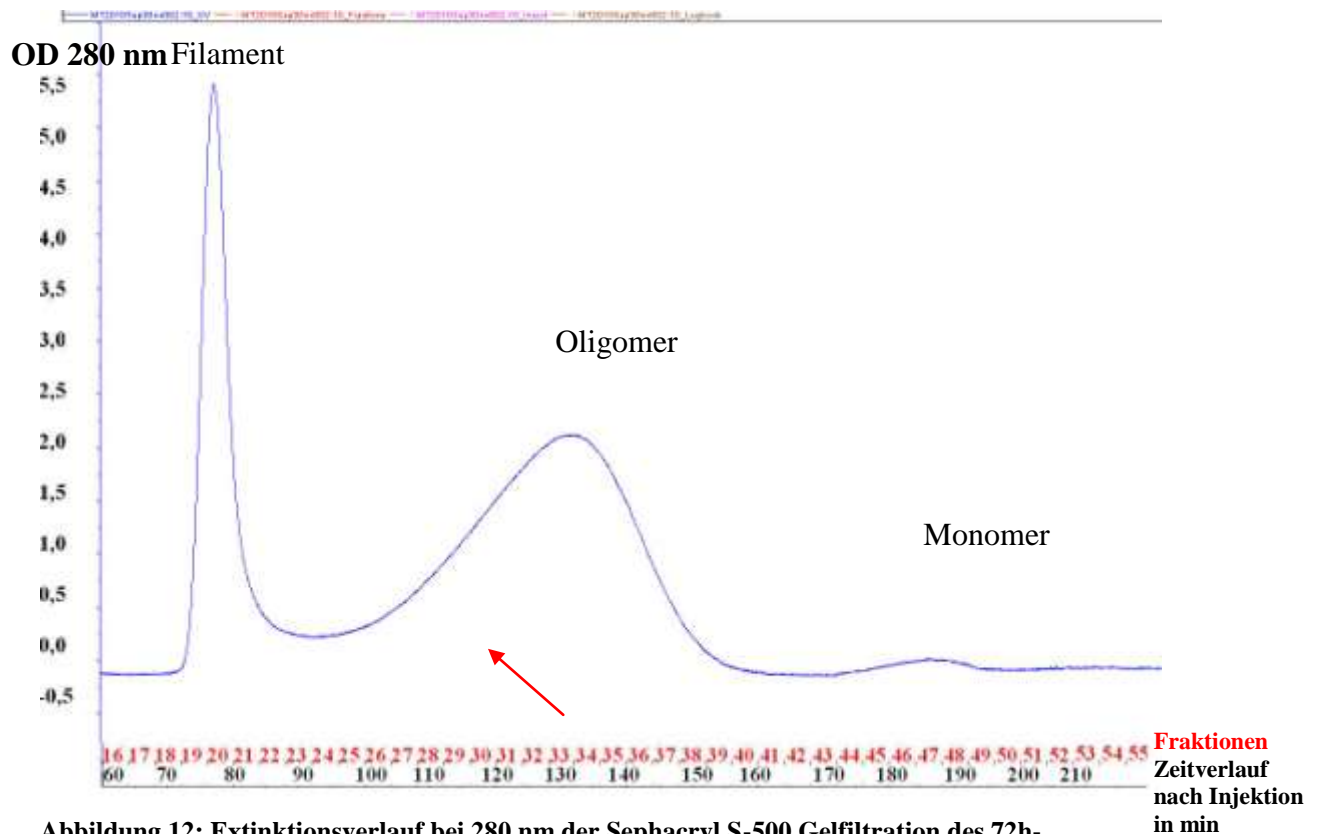


Abbildung 12: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 72h-Aggregationsansatzes; Pfeil: Verbreiterung des Oligomerpeaks in Richtung Filament

In der Abbildung 13 ist das SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie R250 Färbung dargestellt, auf das ausgewählte Proben der Fraktionen des 72h-Aggregationsansatzes aufgetragen wurden. Die Banden bei den Filament-repräsentierenden Proben sind hier erwartungsgemäß deutlicher als in dem 24h-Aggregationsansatz. Dass die Banden jedoch schwächer sind als die Oligomerbanden lässt darauf schließen, dass die Filamente so groß und kompakt sind, dass sie nicht vollständig durch den SDS-Probenpuffer solubilisiert werden, dadurch nicht in das Trenngel hineinwandern und bei der Färbung nicht zu erkennen sind. Bei den Oligomerproben zeigen sich wieder höhermolekulare Banden (siehe Pfeil), welche die Aggregation verdeutlichen. Da in dem Extinktionsverlauf der Sephacryl S-500-Gelfiltration bei 280 nm kein nennenswerter Monomerpeak zu verzeichnen ist, ist auf dem Gel erwartungsgemäß auch keine Bande bei den aufgetragenen Monomerproben zu erkennen.

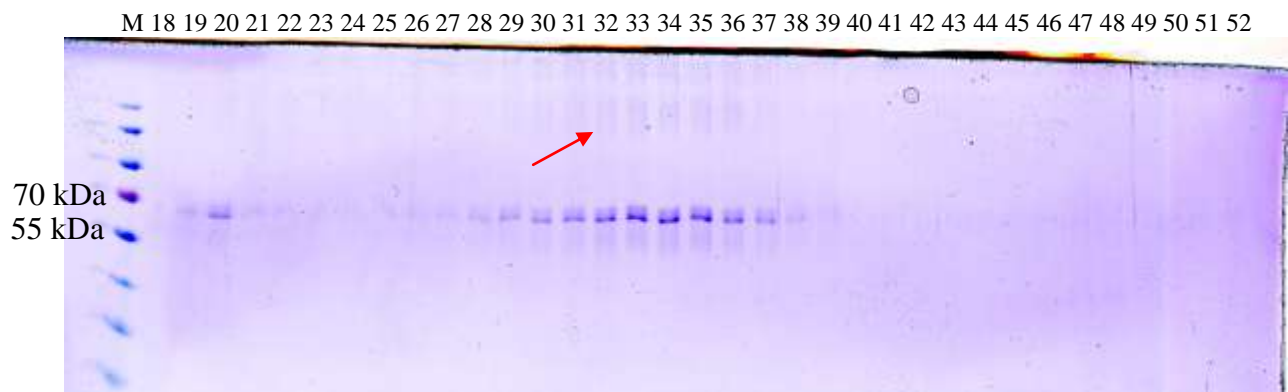


Abbildung 13: 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, 18 – 52: ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 72h-Aggregationsansatzes, M: Proteinstandard, Pfeil: Oligomerschmier

Abbildung 14 zeigt den Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 120h-Aggregationsansatzes. Entgegen der anfänglichen Vermutung, hier noch mehr Filament als in dem 72h-Aggregationsansatz vorzufinden, zeigt sich hier ein anderes Bild: Der Filamentpeak ist ein wenig kleiner als in dem 72h-Aggregationsansatz, dafür bildet sich zwischen dem Filament- und Oligomerpeak eine Art „Schulter“ (siehe Pfeil) aus, welche weiter aggregierte Oligomere repräsentiert, die allerdings noch keine typische Filamentgröße haben. Überraschenderweise ist hier jedoch auch wieder ein Monomerpeak zu verzeichnen, was darauf hindeutet, dass die Oligomere und/oder Filamente nicht völlig stabil sind und wieder in Monomere zerfallen können.

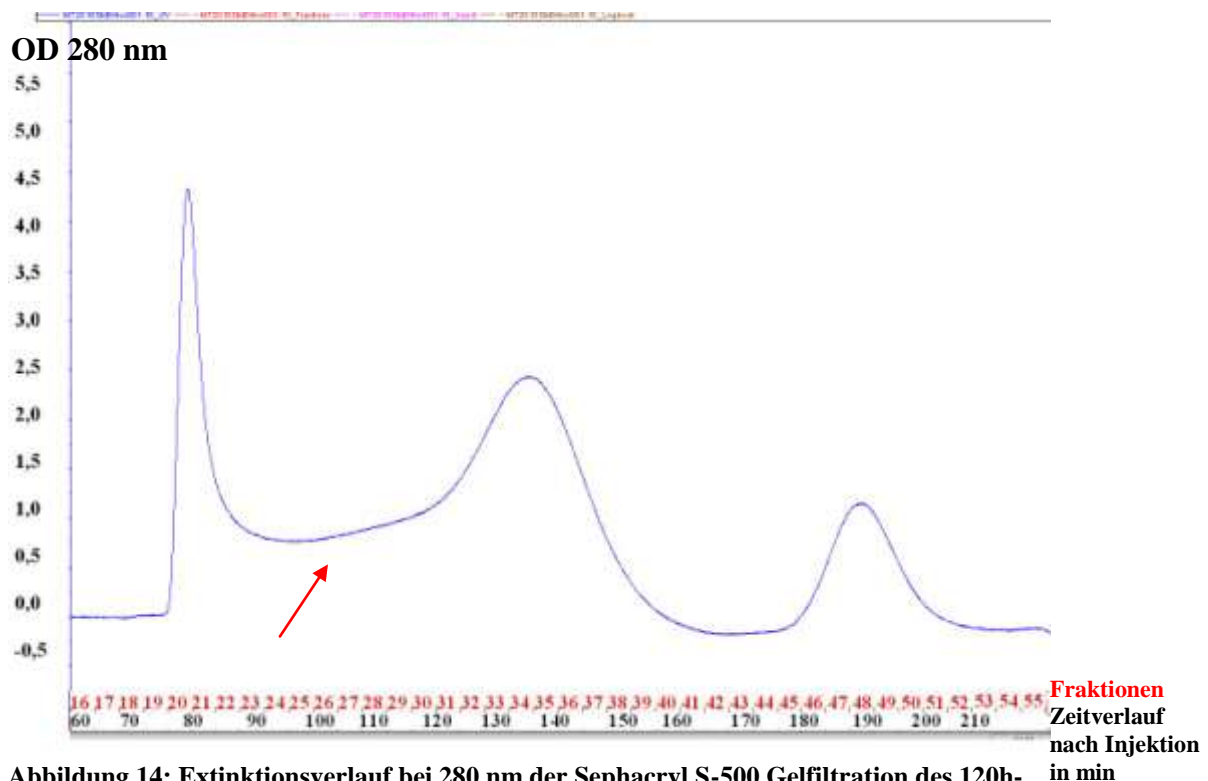


Abbildung 14: Extinktionsverlauf bei 280 nm der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 120h-Aggregationsansatzes; Pfeil: „Schulter“ zwischen Filament- und Oligomerpeak

Abbildung 15 zeigt das SDS-Polyacrylamidgel der Proben des 120h-Aggregationsansatzes. Die Banden der Filamentproben sind schwach erkennbar, die der Oligomerproben (einschließlich Schmier) deutlicher und bei den Monomerproben zeigen sich ebenfalls wieder sehr deutliche Banden auf.



Abbildung 15: 8 %iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung, 18 – 52: ausgewählter Proben von Fraktionen der Sephacryl S-500 Gelfiltration des 120h-Aggregationsansatzes, M: Proteinstandard, Pfeil: Oligomerschmier

4.2 Untersuchung ausgewählter FPLC-Fractionen auf Proteinmenge „denaturiertes“ Tau-Protein und β -Faltblattstrukturen

Fluorescamin (auch Fluoram) gibt Hinweise auf den Proteingehalt in der jeweiligen Fraktion. Hierfür wird zuvor eine BSA-Eichkurve erstellt, um die Fluoreszenz mit Proteinmengen in Verbindung bringen zu können. ANS detektiert exponierte hydrophobe Bereiche des Tau-Proteins, welche für fehlgefaltete Proteine charakteristisch sind. Thioflavin S erkennt die Menge an β -Faltblattstrukturen, welche bei aggregiertem Tau-Protein vorkommen. Seine Fluoreszenz ist höchstwahrscheinlich proportional zur Menge an in der Probe enthaltenen amyloidogenen Proteins [Yao et al., 2003].

Die Abbildungen 16 - 19 zeigen die Auswertungen der Fluoreszenzmessungen mit ANS, Thioflavin-S und Fluorescamin. Bei dem Kontroll-Aggregationsansatz (ohne Heparin, 0 h) in Abbildung 16 ist erkennbar, dass die Kurve der Fluoreszenz von Fluorescamin deutlich im Bereich des Monomerpeak ansteigt. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert hierbei mit der in den Proben enthaltenen Proteinmenge. Die ANS/Thioflavin-S Fluoreszenzintensitäten steigen jedoch nur geringfügig. Dies stimmt mit der Erwartung überein, da diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe keine Monomere erkennen.

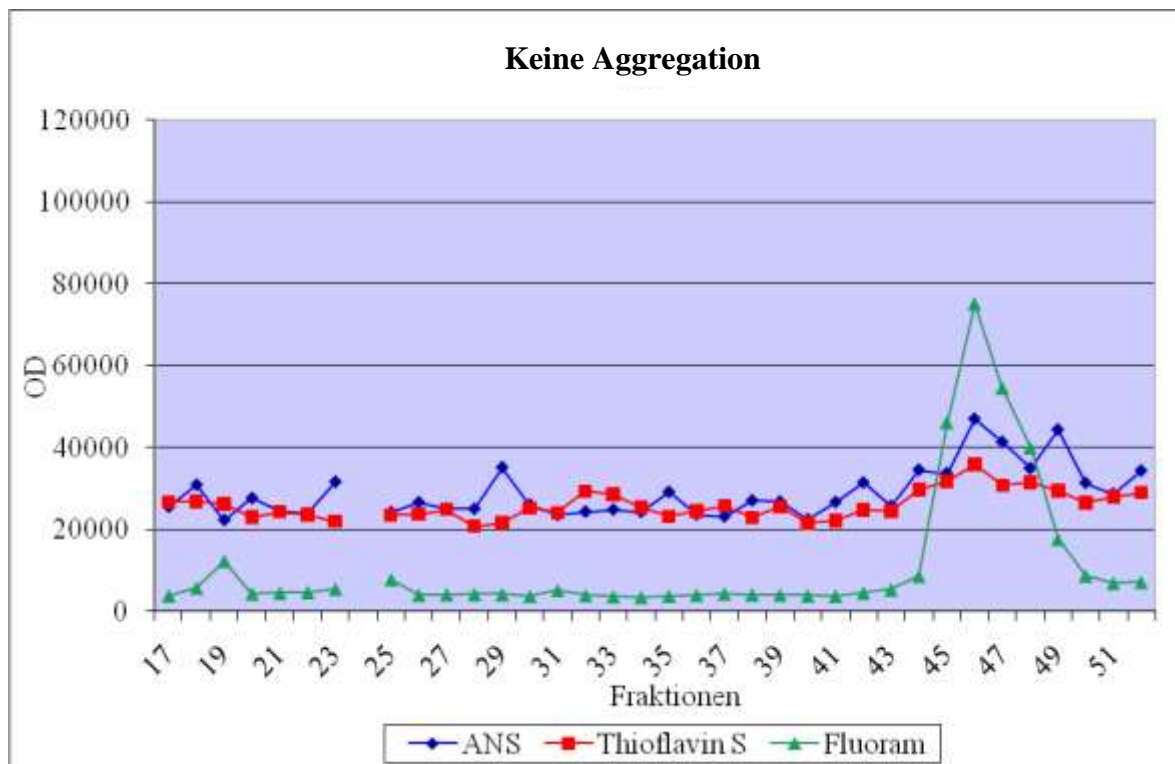


Abbildung 16: Fluoreszenz-Assays des 0h-Aggregationsansatzes: ANS detektiert exponierte hydrophobe Bereiche, Thioflavin S β -Faltblattstrukturen und Fluorescamin gibt Aufschluss über die Gesamtproteinmenge

Bei dem Diagramm des 24h-Aggregationsansatzes (Abbildung 17) zeigt die das Gesamtprotein repräsentierende Fluorescaminkurve, wie erwartet, auch bei den oligomertypischen Fraktionen einen Anstieg, die Filamente werden jedoch nicht so gut erkannt. Dies könnte daran liegen, dass die filamentösen Strukturen so dicht gepackt sind, dass die zu detektierenden Bereiche nicht „frei“ liegen, und so β -Faltblattstrukturen nicht optimal erkannt werden. ANS und zeigt sowohl bei den Filamenten, als auch bei den Oligomeren ein erhöhtes Signal, Thioflavin S zunächst nur bei den Oligomeren.

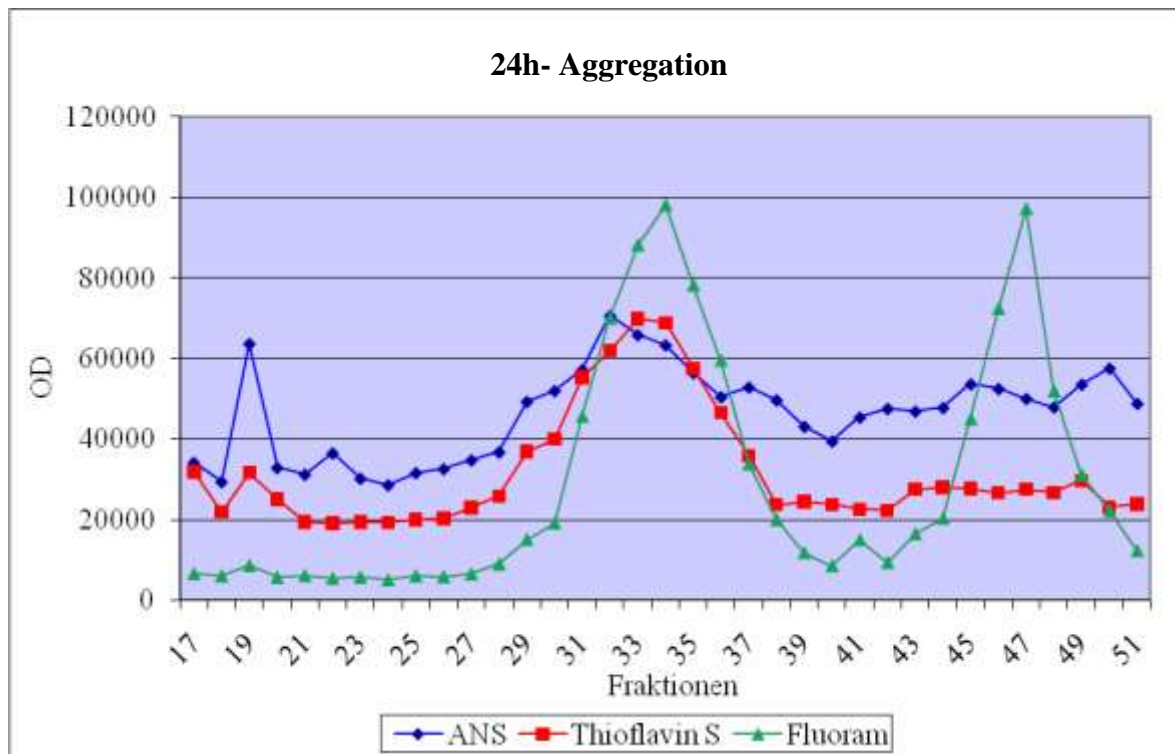


Abbildung 17: Fluoreszenz-Assays des 24h-Aggregationsansatzes: ANS detektiert exponierte hydrophobe Bereiche, Thioflavin S β -Faltblattstrukturen und Fluorescamin gibt Aufschluss über die Gesamtproteinmenge

Bei dem 72h-Aggregationsansatz (siehe Abbildung 18) ist, wie erwartet, kaum Fluoreszenzaktivität des Fluorescamins (Gesamtprotein) bei den Monomeren zu verzeichnen. Bei den Oligomeren und Filamenten hingegen zeigt sich eine Reaktion mit allen drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen. Der fehlende Messwert rührt daher, dass es bei der entsprechenden Probe zu einer Verunreinigung kam, zu verfälschten Messdaten führte

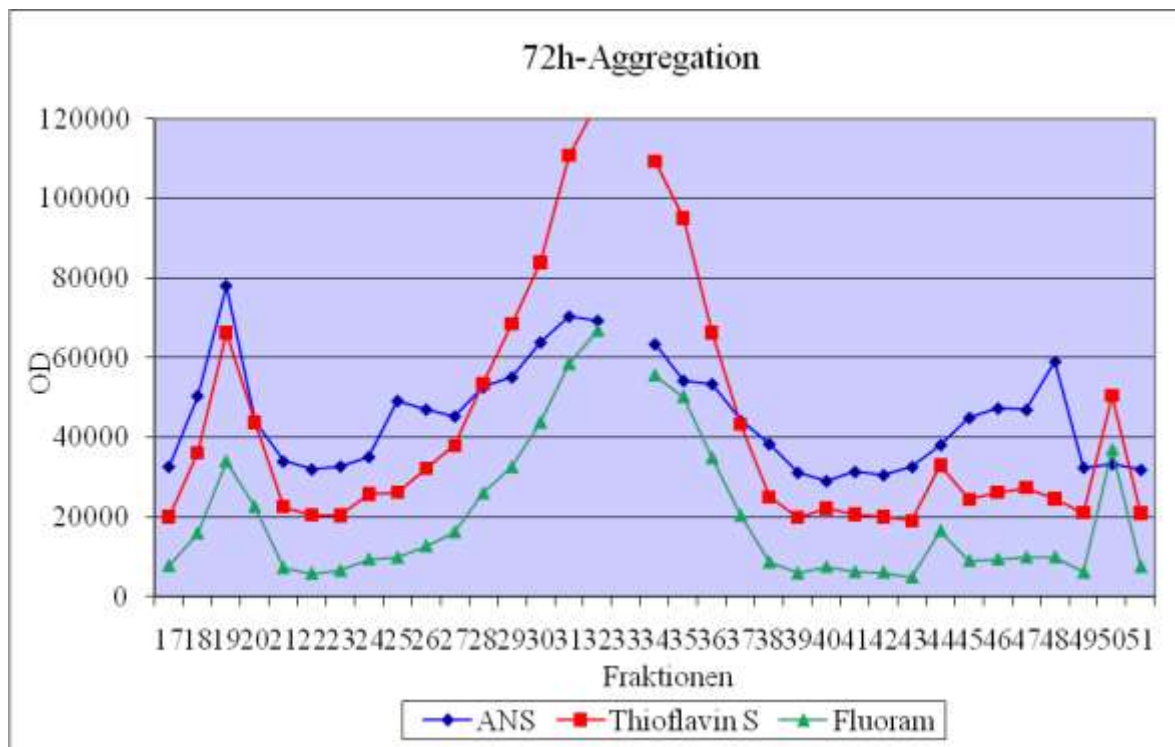


Abbildung 18: Fluoreszenz-Assays des 72h-Aggregationsansatzes: ANS detektiert exponierte hydrophobe Bereiche, Thioflavin S β -Faltblattstrukturen und Fluorescamin gibt Aufschluss über die Gesamtproteinmenge

Bei dem 120h-Aggregationsansatz (siehe Abbildung 19) zeigt sich sowohl bei Filamenten, als auch bei Oligomeren eine Reaktivität mit ANS und Thioflavin S, was auf Anwesenheit von amyloidogenen Protein, und damit auch β -Faltblattstrukturen schließen lässt. Diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe zeigen für gewöhnliche keine Reaktion mit Monomeren des Tau-Proteins, was jedoch bei ANS hier der Fall ist. Die ermittelten Messdaten weisen darauf hin, dass die Tau-Oligomere möglicherweise instabil sind. Es wäre möglich, dass die Oligomere wieder zu Monomeren zerfallen, die oligomertypische Proteinkonformation, bzw. β -Faltblattstrukturen, jedoch erhalten bleibt, sodass sie von ANS erkannt werden. Die Fluorescamin-Fluoreszenz deutet besonders bei den Oligomerfraktionen auf eine erhöhte Proteinmenge hin.

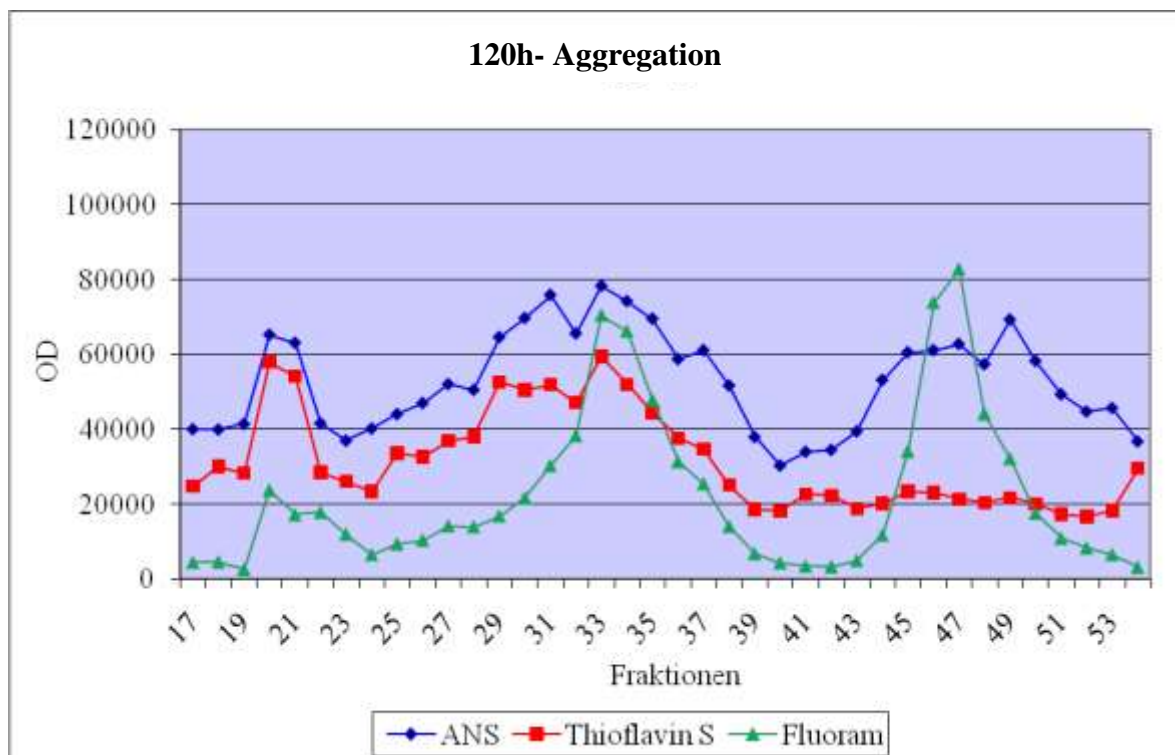


Abbildung 19: Fluoreszenz-Assays des 120h-Aggregationsansatzes: ANS detektiert exponierte hydrophobe Bereiche, Thioflavin S β -Faltblattstrukturen und Fluorescamin gibt Aufschluss über die Gesamtproteinmenge

Die für die Ermittlung des Proteingehaltes verwendete BSA-Eichkurve ist in Abbildung 20 dargestellt. Sie zeigt, wie die ermittelten Fluoreszenzwerte des Fluorescamins mit den in den Proben enthaltenen Proteinmengen korrelieren.

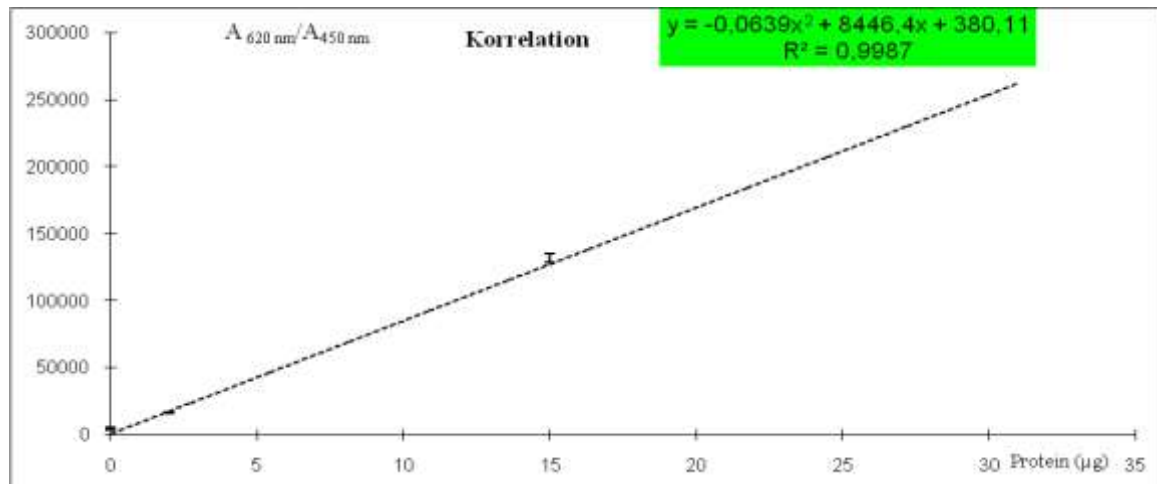


Abbildung 20: BSA-Eichkurve zur Gesamtproteinmengenbestimmung mittels Fluorescamin: definierte Mengen von BSA wurden mittels Fluorescamin auf Fluoreszenz untersucht und die ermittelten Werte in Abhängigkeit der Proteinmenge aufgetragen

4.3 Oligomer-ELISA

Der Oligomer-ELISA beruht auf der Anwendung eines Protein-unspezifischen, Sekundärstruktur-spezifischen Amyloid-Oligomer-Antikörpers. Es erfolgt die Bindung des Tau-Proteins an diesen Antikörper. Das gebundene Tau-Protein, welches ausschließlich durch Oligomere vertreten sein sollte, wird durch einen gesamt-Tau-Antikörper detektiert. Dieser erkennt alle Formen des Tau-Proteins. Da allerdings die ELISA-Platte mit einem Oligomer-Antikörper beschichtet wurde, dürften nur amyloidogene Formen des Tau-Proteins daran binden.

Die Auswertung (Abbildungen 21 und 22) zeigt kein sehr klares Bild. Die Fraktionen 26 und 47 zeigen bei den im Kühlschrank aufbewahrten Proben (vgl. Abbildung 21) ein höheres Signal. Hingehen sind die Fraktionen 17 und 29 bei den eingefrorenen Proben (vgl. Abbildung 22) reaktiver. Es konnte also nicht gezeigt werden, ob die Oligomerfraktionen durch das Einfrieren (oder längeres Aufbewahren) wieder zerfallen oder nicht. Der Versuch müsste erneut durchgeführt werden, da die Methode des ELISA viele Fehlerquellen, wie Pipettierfehler oder Blasenbildung in der Mikrotiterplatte birgt.

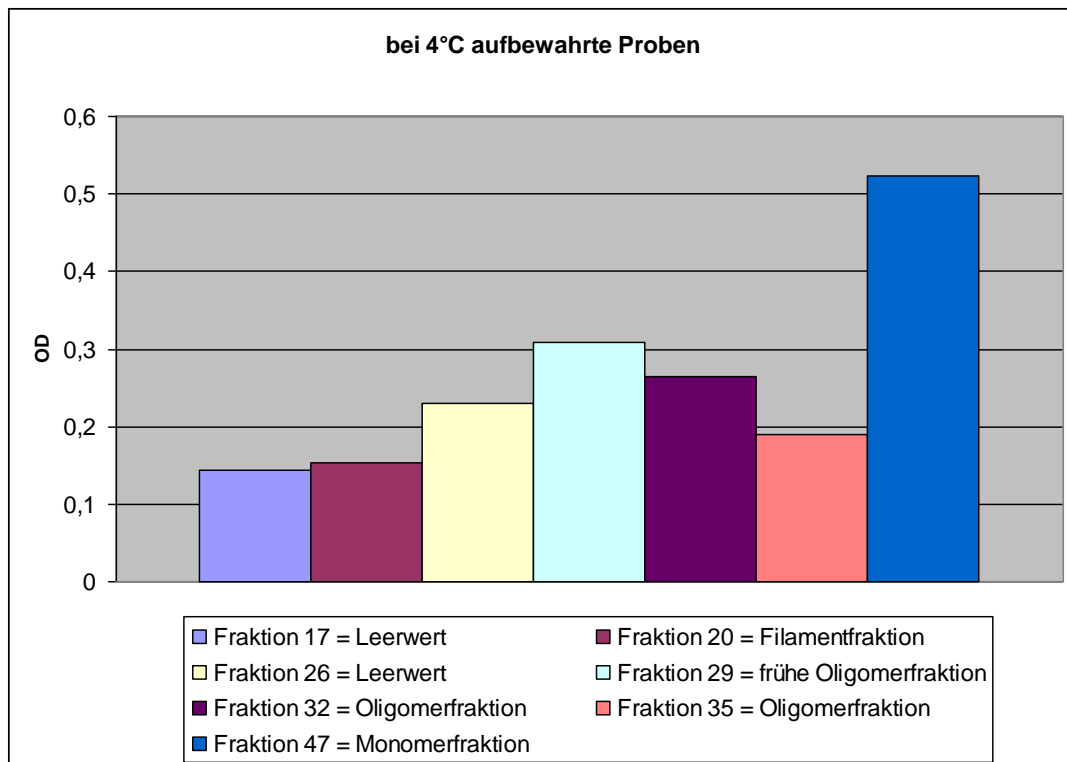


Abbildung 21: Oligomer-ELISA: Reaktionen verschiedener Fraktionen mit einem Oligomer-spezifischen Antikörper , bei 4 °C aufbewahrte FLPC-Fraktionen der 24h-Agregation

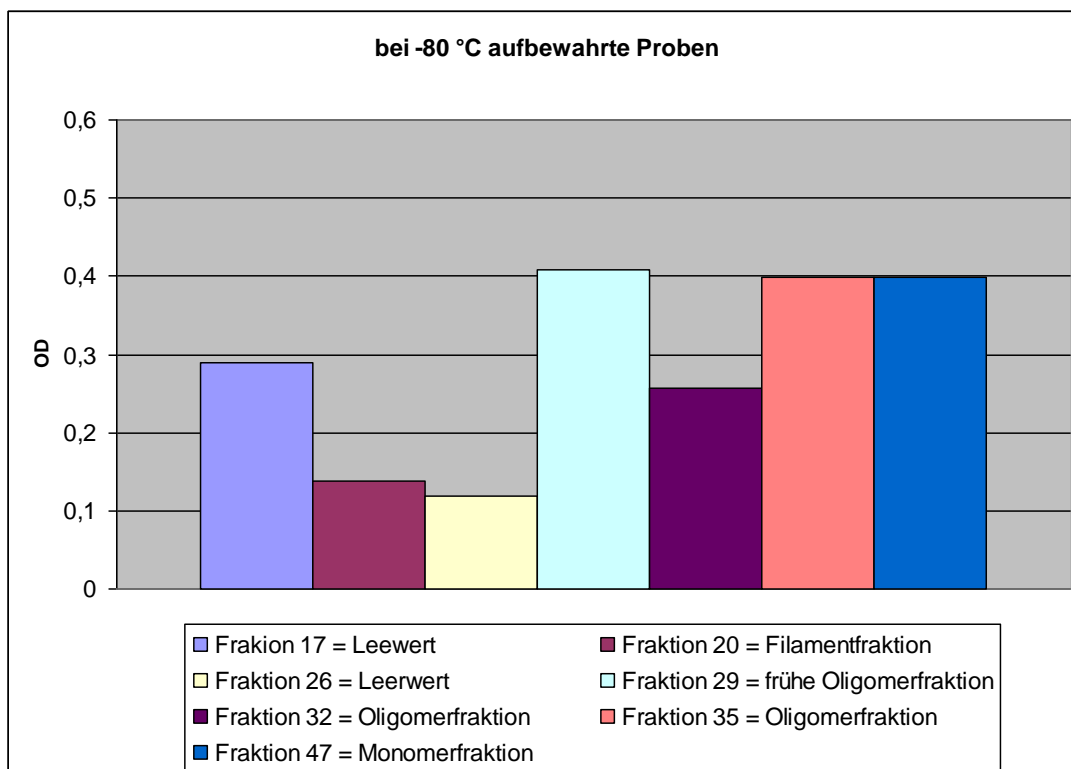


Abbildung 22: Oligomer-ELISA: Reaktionen verschiedener Fraktionen mit einem Oligomer-spezifischen Antikörper , bei -70 °C eingefrorene FPLC-Fraktionen der 24h-Agregation

4.4 MTT- Assay

Der MTT-Assay dient zur Quantifizierung der Zellvitalität nach Exposition mit verschiedenen Tau-Protein-Fractionen nach Gelfiltration. In den Abbildungen 23 - 26 sind die Auswertungen des MTT-Assays zu erkennen. Allerdings lässt die Auswertung hierbei keine eindeutigen Erkenntnisse zu. Fraktion 19 stellt hierbei vermutlich jeweils eine Filament-, Fraktion 33 eine Oligomer-, und Fraktion 47 eine Monomer-enthaltene (sofern vorhanden) Fraktion dar.

Im 0h-Aggregationsansatz (Abbildung 23) sind keine wesentlichen Unterschiede der MTT-Umsetzung zwischen den drei gewählten Fraktionen, sowie zwei der drei Kontrollen zu verzeichnen. Dies wäre dadurch erklärbar, dass die Tau-Monomere in Zellkultur nicht toxisch sind und sowohl keine toxischen Oligomere als auch Filamente in diesem Aggregationsansatz vorhanden waren. Die (genauso) hohe Reaktivität der SY5Y-Zellen in zwei Kontrollansätzen stimmt ebenfalls mit den Erwartungen überein, da diese Zellen überhaupt nicht mit dem Tau-Protein behandelt wurden. Der niedrige Wert bei der Kontrolle der lysierten (toten) Zellen stellt eine Negativkontrolle dar.

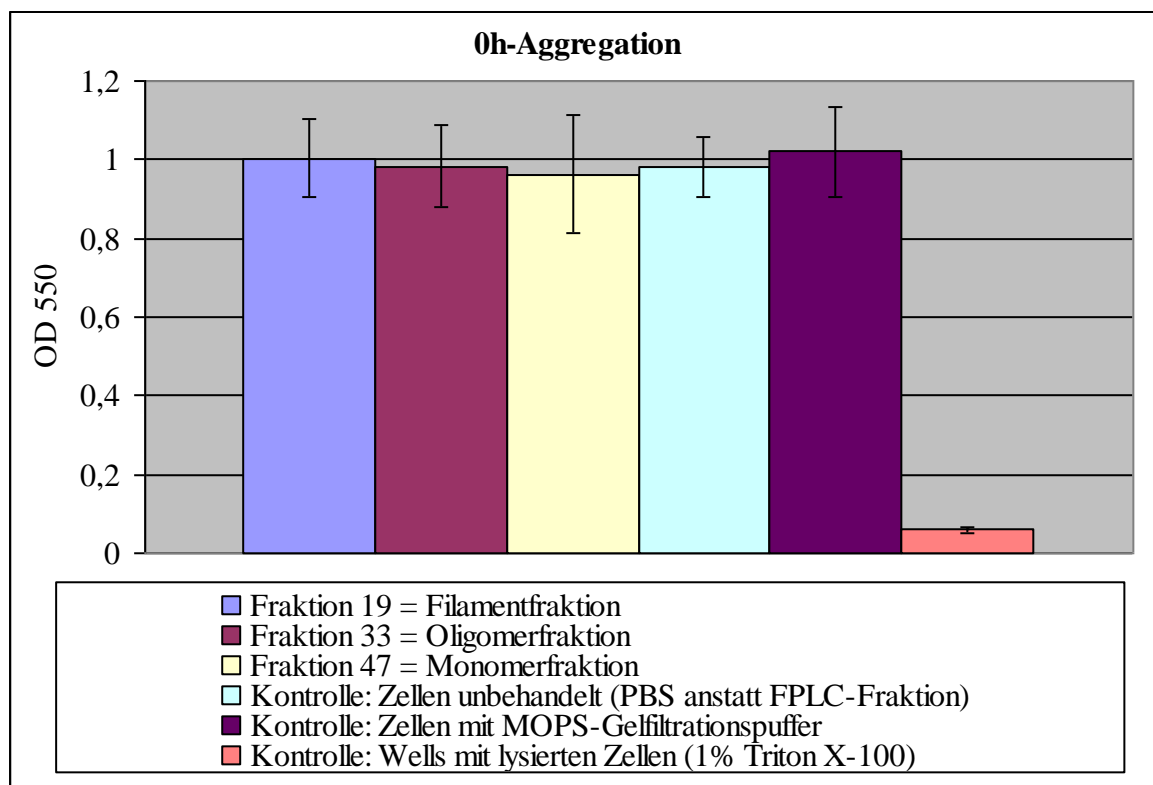


Abbildung 23: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit unaggregiertem Tau-Protein

Jedoch müsste, nach vorherrschender Theorie, das Bild im 24h-Aggregationsansatz (Abbildung 24) deutlich anders aussehen. Hier ist lediglich die Vitalität der SY5Y-Zellen, welche mit Tau-Filament behandelt wurden, herabgesetzt, zwischen Oligomer- und Monomerfraktion besteht jedoch kein wesentlicher Unterschied. Dies sollte jedoch nach unserer Hypothese der Fall sein, da in diesem Aggregationsansatz bereits Oligomere vertreten waren, welche einen toxischen (MTT-Reaktion hemmenden) Einfluss auf die Zellen haben können.

Da hier ebenfalls die 2 Kontrollen der unbehandelten Zellen eine ähnlich hohe Aktivität aufweisen, ist davon auszugehen, dass die Tau- Oligomere hier keinen toxischen Einfluss auf die SY5Y-Zellen hatten. Eine Möglichkeit hierfür wäre, dass das Oligomer in der entsprechenden Fraktion zu gering konzentriert waren, um die Vitalität der SY5Y-Zellen entscheidend zu beeinträchtigen. Die Vitalität der lysierten Zellen (Negativkontrolle) ist hier erwartungsgemäß gering.

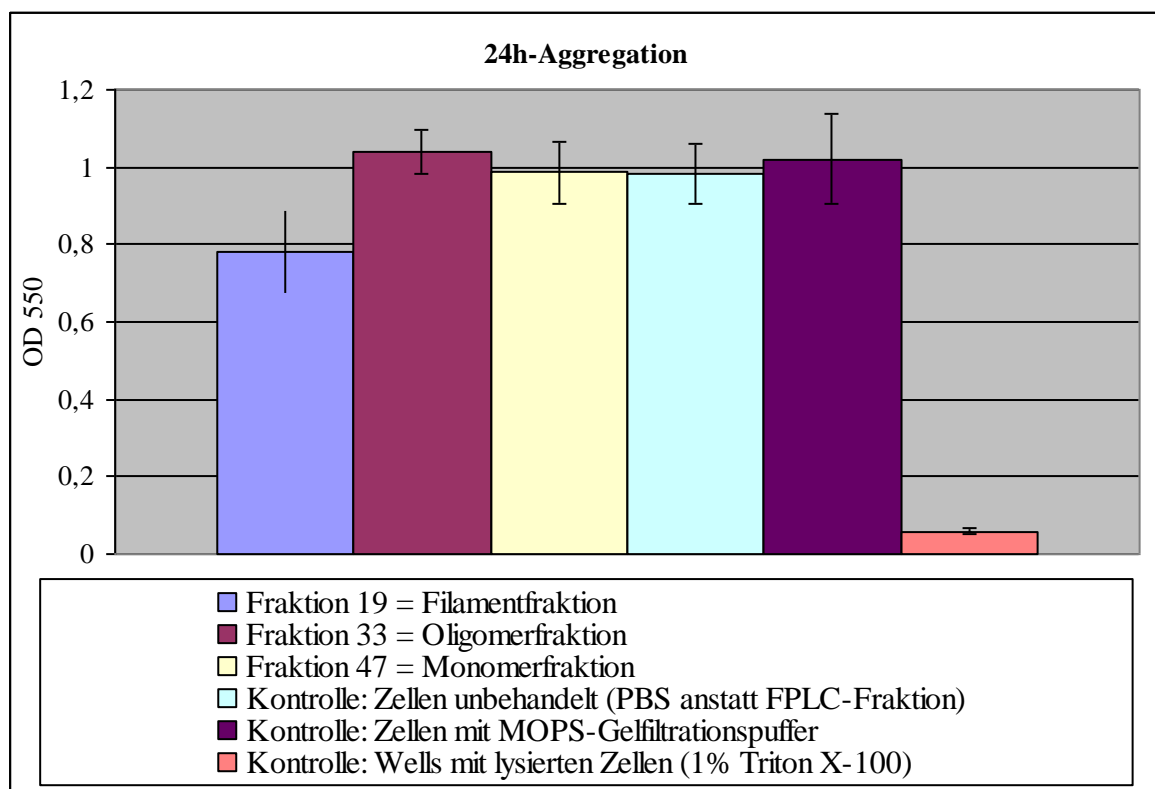


Abbildung 24: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 24h aggregiertem Tau-Protein

Abbildung 25 zeigt die Auswertung des MTT-Testes unter Verwendung des 72h-Aggregationsansatzes. Hier ist die Reaktivität der SY5Y-Zellen bei dem Oligomer zwar, wenn auch nur geringfügig, herabgesetzt, allerdings ist dies kein Beweis für seine besondere Toxizität. Da die MTT-Umsetzung bei den Zellen, welche mit der Filament-Fraktion behandelt wurden, noch weiter herabgesetzt ist, würde dies bedeuten, dass Tau-Filamente in Zellkultur einen größeren Einfluss auf die Zellvitalität haben als die Oligomere.

Denkbar wäre hierbei, dass die Oligomerkonzentration noch zu niedrig war und die Tau-Filamente aufgrund der Aufbewahrung in toxische Oligomere, die Oligomere hingegen stabil oder nur zu einem geringen Teil in Monomere zerfallen sind.

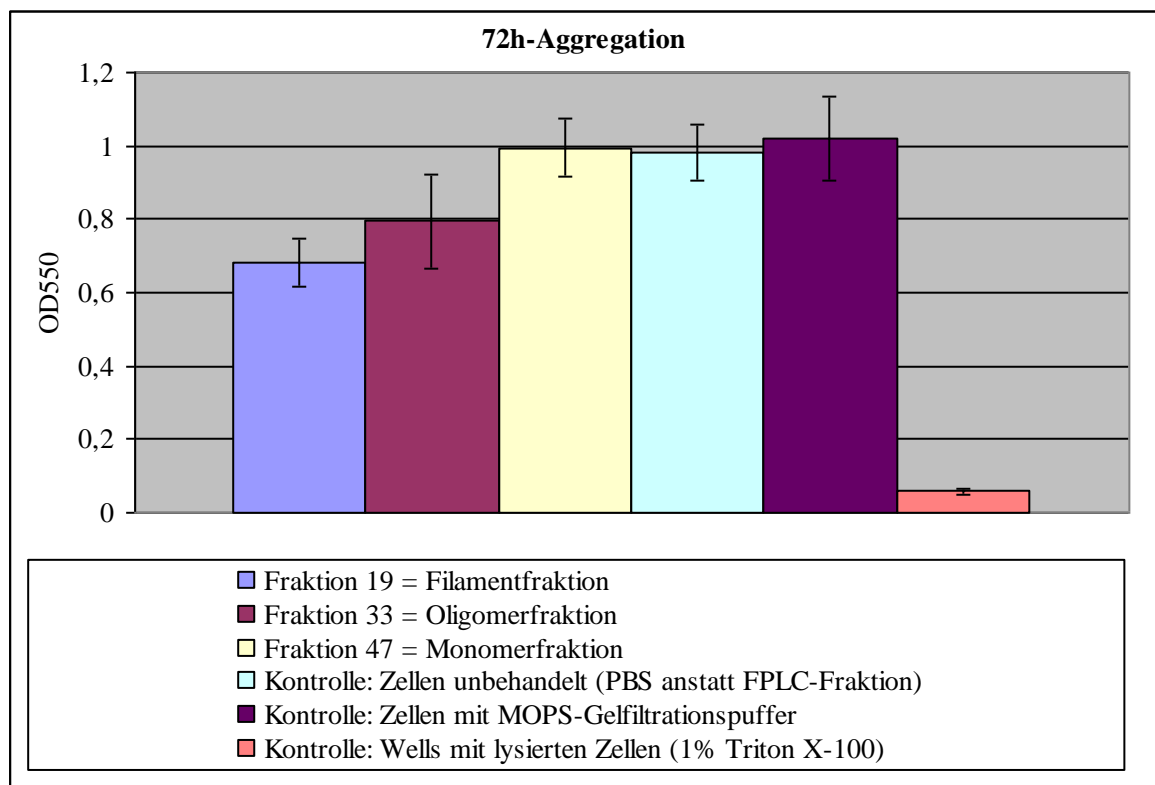


Abbildung 25: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 72h aggregiertem Tau-Protein

Die Inkubation mit Fraktionen des 120h-Aggregationsansatzes (Abbildung 26) führten zu einer Verringerung der Zellvitalität. Die relativ hohe Vitalität der Oligomer-behandelten Zellen lässt sich wieder nur durch eine zu geringe Konzentration des Oligomers und einem Zerfall in Monomere erklären. Allerdings behält bei diesem Zerfall sehr wahrscheinlich ein Teil des Monomeres seine oligomertypische Konformation, was in einer erhöhten Monomer-Toxizität resultiert. Die geringere Vitalität der Filament-behandelten Zellen resultiert wahrscheinlich aus einem Zerfall des Filaments in toxische Oligomere.

Hiermit steht demzufolge die Vermutung im Raum, dass sowohl Filamente, als auch Oligomere wieder in monomere Strukturen zerfallen können. Ist die Aggregation allerdings von längerer Dauer (in diesem Versuch 120 h), ist das monomere Tau-Protein von der Konformation - und damit Toxizität her eher mit Oligomeren zu vergleichen.

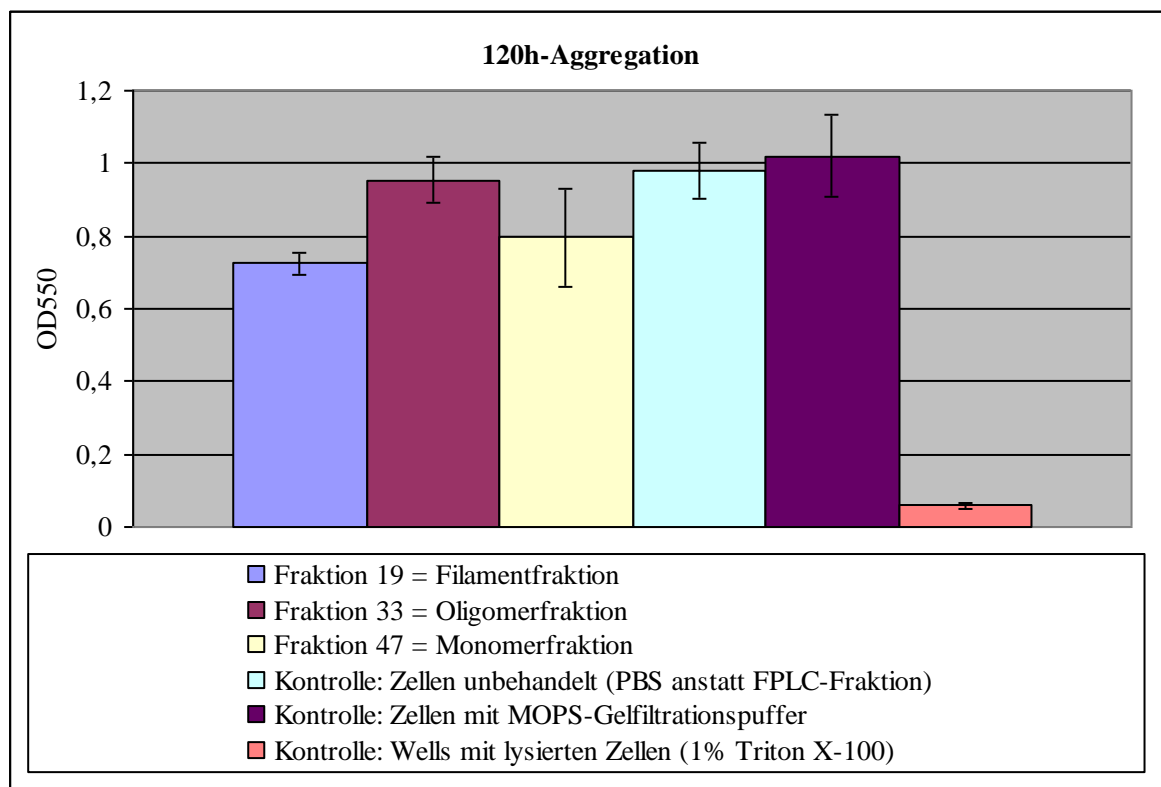


Abbildung 26: MTT-Test an SY5Y-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 120h aggregiertem Tau-Protein

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob Bakterien, welche (nachgewiesenermaßen) in die später aggregierten Fraktionen gelangt sind und sich in Zellkultur vermehrt haben, einen deutlichen Einfluss auf die MTT-Umsetzung hatten. So wurde die starke MTT-Reaktion im Zellkulturüberstand beobachtet, die jedoch auf eine Akkumulation des Formazan-Farbstoffes in den Bakterien zurückzuführen war. Nach dem Waschen der Zellkultur mit

PBS konnte die bakterielle Komponente entfernt werden und nur die Akkumulation des Formazanfarbstoffes der SY5Y-Zellen durch Lyse mit DMSO gemessen werden.

Überdies erfolgte bei den Proben mit Bakterien eine ähnlich hohe MTT-Reaktion, was darauf schließen lässt, dass die Zellen trotz der bakteriellen Verunreinigung noch ausreichend MTT und Wachstumsmedium zur Verfügung hatten. Bedeutende einschränkende Effekte der Bakterien auf die Zellen, durch eventuelle Toxine können ebenfalls weitgehend ausgeschlossen werden, da zum einen das Medium, in welchem die Zellen mit den entsprechenden Fraktionen für einen Tag inkubierten, keine Anzeichen (z.B. Gelbfärbung) lieferte und zum anderen die Zellen vor den Versuchen unter dem Mikroskop betrachtet makroskopisch gesund aussahen und kein eventueller Einfluss von Bakterien erkennbar war.

Es ist kann also nicht völlig ausgeschlossen werden, dass es durch die Bakterien zu einer geringfügigen Verfälschung der MTT-Messdaten kam, allerdings sollte diese anhand der durchgeführten Kontrollen von untergeordneter Bedeutung sein.

4.5 LDH- Assay

Der LDH-Assay erlaubt die Bestimmung der Integrität der Zellmembran. Lysierte Zellen und Zellen mit Porenbildung geben das zytoplasmatische Enzym Lactatdehydrogenase ins Medium ab. Dort kann dann die enzymatische Aktivität dieses Enzyms mittels eines gekoppelten chromogenen Assays gemessen werden.

Bei dem 0h-Aggregationsansatz (siehe Abbildung 27) fällt zunächst die Kontrolle der lysierten Zellen auf. Hierbei handelt es sich um eine Positivkontrolle (im Gegensatz zum MTT-Assay), welche einen 100%-Wert darstellt. Da in dieser Probe alle Zellen lysiert waren ist hierbei die komplette LDH-Enzymmenge im Medium vorhanden und die LDH-Aktivität am stärksten. Außer dieser Kontrolle wurde bei allen Proben nahezu eine ähnliche Reaktion gemessen. Eine weitere Kontrolle, in der die Zellen nur mit Puffer ohne Tau-Protein inkubiert wurden, ist, erwartungsgemäß, weniger reaktiv. Alle anderen Ansätze, einschließlich der unbehandelten Zellen, bei denen PBS zugegeben wurde, haben annähernd identische Werte. Dies könnte daher rühren, dass die in den FPLC-Fraktion 47 enthaltenen Tau-Proteine keinen akuten Zelltod verursachen oder die Integrität der Zellmembran stören und die Fraktionen 33 und 19 des unaggregierten Proteins als Leerwert dienen.

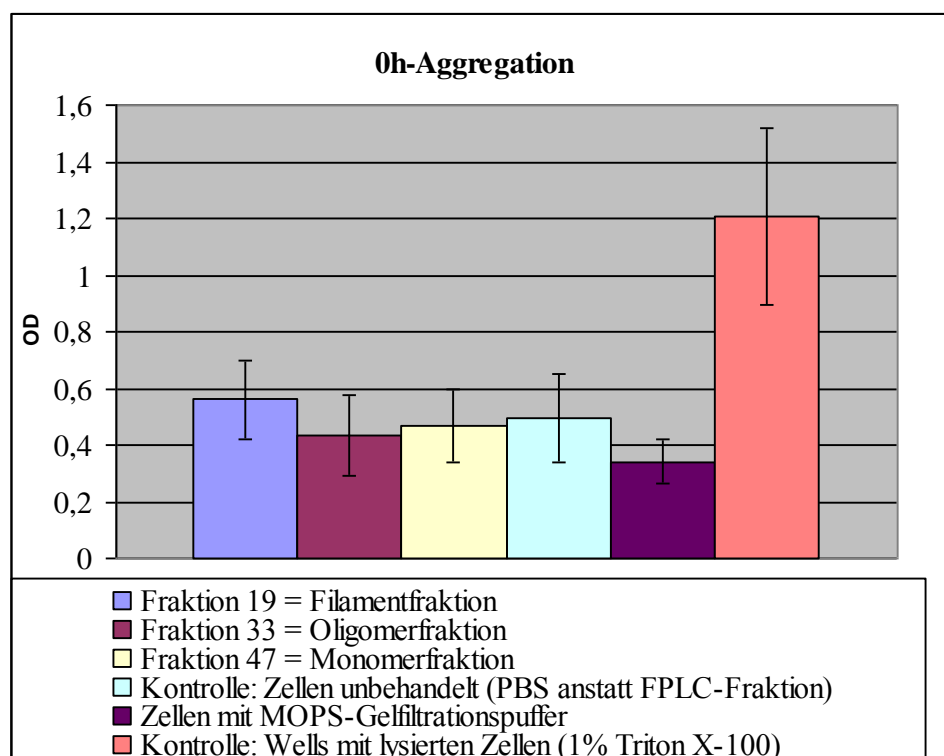


Abbildung 27 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit unaggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden

Bei dem 24h-Aggregationsansatz (Abbildung 28) ist die Positivkontrolle der lysierten Zellen ebenfalls als 100%-Wert zu sehen. Die Kontrolle der Zellen, wo nur MOPS-Gelfiltrationspuffer zugegeben wurde, ist relativ gering, wohingegen die anderen Reaktionsansätze keine wesentlichen Unterschiede aufweisen. Der Ansatz, zu dem die Monomerfraktion 47 zugegeben wurde, ist gegenüber den anderen lediglich geringfügig erhöht. Diese Erhöhung könnte durch eine Aggregation der Monomere zu Oligomeren oder durch eine zu hohe Konzentration der eigentlich nicht-toxischen Monomere in den Proben hervorgerufen worden sein.

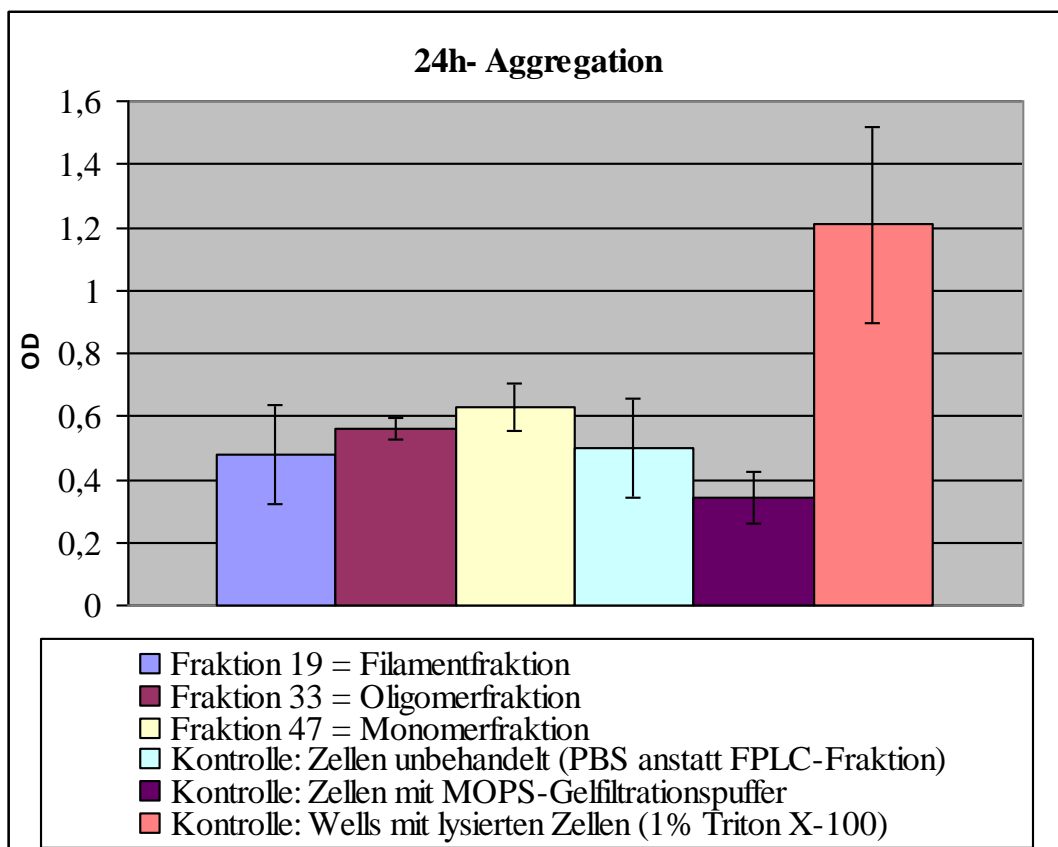


Abbildung 28 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit 24h-aggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden

Bei dem 72h-Aggregationsansatz, dessen LDH-Auswertung in Abbildung 29 zu sehen ist, verhält es sich mit den Kontrollen wie in den ersten beiden Abbildungen. Hier fällt jedoch auf, dass die Reaktion der Monomerfraktion deutlich geringer ist als die der Oligomerfraktion, was allerdings darauf zurückzuführen ist, dass bei der 72h-Aggregation fast kein Tau-Monomer mehr vorhanden war und sich die Verteilung eher auf die hier deutlich reaktiveren Oligomere, aber auch auf die Filamente konzentrierte.

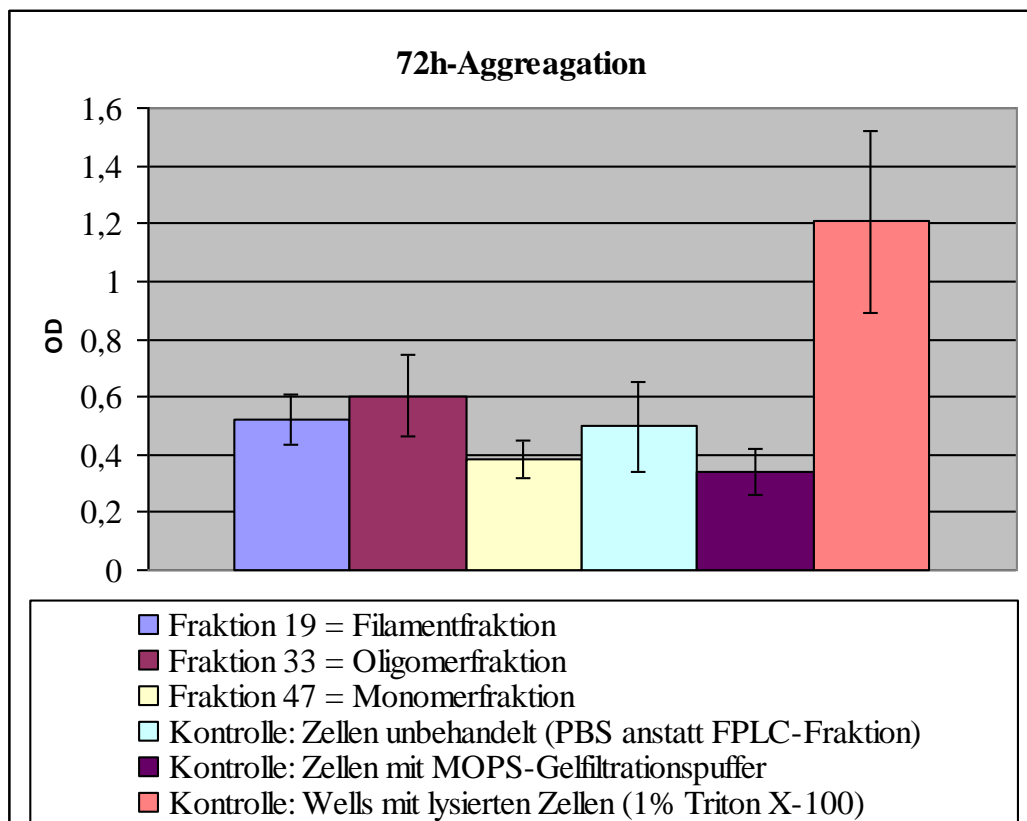


Abbildung 29 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit 72h-aggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden

Bei dem 120h-Aggregationsansatz (siehe Abbildung 30) ist, neben ähnlichen Ergebnissen der Kontrollen wie in den vorangegangenen Abbildungen, ein geringfügiger Abfall der Reaktivität von der Filament- über die Oligomer- hin zur Monomerfraktion zu verzeichnen. Dieser ist allerdings nicht sehr deutlich und lässt nur vermuten, dass die Tau-Filamente genauso toxisch sind wie die Oligomere.

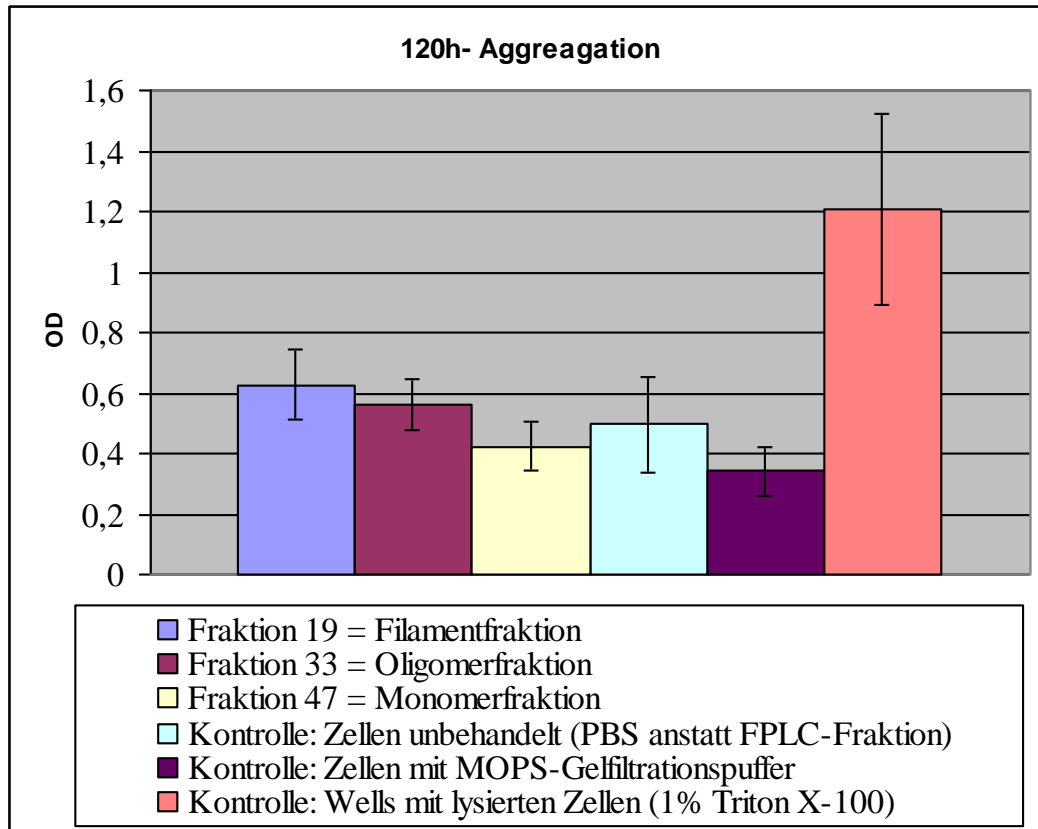


Abbildung 30 LDH-Test im Medium von SY5Y-Zellen, welche 24h mit 120h-aggregiertem Tau-Protein kultiviert wurden

Zusammenfassend lassen die Toxizitätstests vermuten, dass das Tau-Oligomer doch nicht die (einzige) toxische Spezies der Aggregationsintermediate ist. Diese Annahme müsste allerdings in weiteren Experimenten untersucht werden. Der Zerfall sowohl von Filamenten, als auch von Oligomeren und die Aggregation von zuvor aufgetrennten Monomeren ist hierbei immer noch eine Möglichkeit, welche die Ergebnisse beeinflusst.

4.6 Western Blot

Um die Stabilität des Tau-Proteins in verschiedenen Fraktionen nach Inkubation mit den SY5Y-Zellen nachzuweisen, wurde ein Western-Blot mit einem anti-Tau-Protein-Antikörper durchgeführt. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse dieser Immuno-Detektion zu sehen. In den meisten Fraktionen, die nach der FPLC Tau-Protein enthielten, konnte mittels Western Blot die Stabilität des Proteins im Zellkulturmedium nachgewiesen werden.

In entsprechenden Kontrollen, wie „Zell“ (Zellen ohne FPLC-Fraktion inkubiert), „Puff“ (Zellen mit FPLC-Puffer inkubiert) oder FPLC-Fraktionen mit wenig Protein (Fraktionen 46 und 47 des 72h-Ansatzes) waren gar keine oder vernachlässigbare Immuno-Reaktion zu erkennen. Die Reaktivität ist in den Spuren, auf welche Fraktionen mit Tau-Protein aufgetragen wurden, deutlich erhöht. Überdies ist vor allem in den Oligomerfraktionen wieder ein Schmier zu erkennen (siehe Pfeile), welche zeigen, dass die Oligomere zumindest größtenteils in Zellkultur stabil bleiben. Somit ist nachgewiesen, dass das Tau-Protein auch nach dem MTT-Test noch in den Proben vorhanden und nicht während der Inkubation degradiert worden ist.

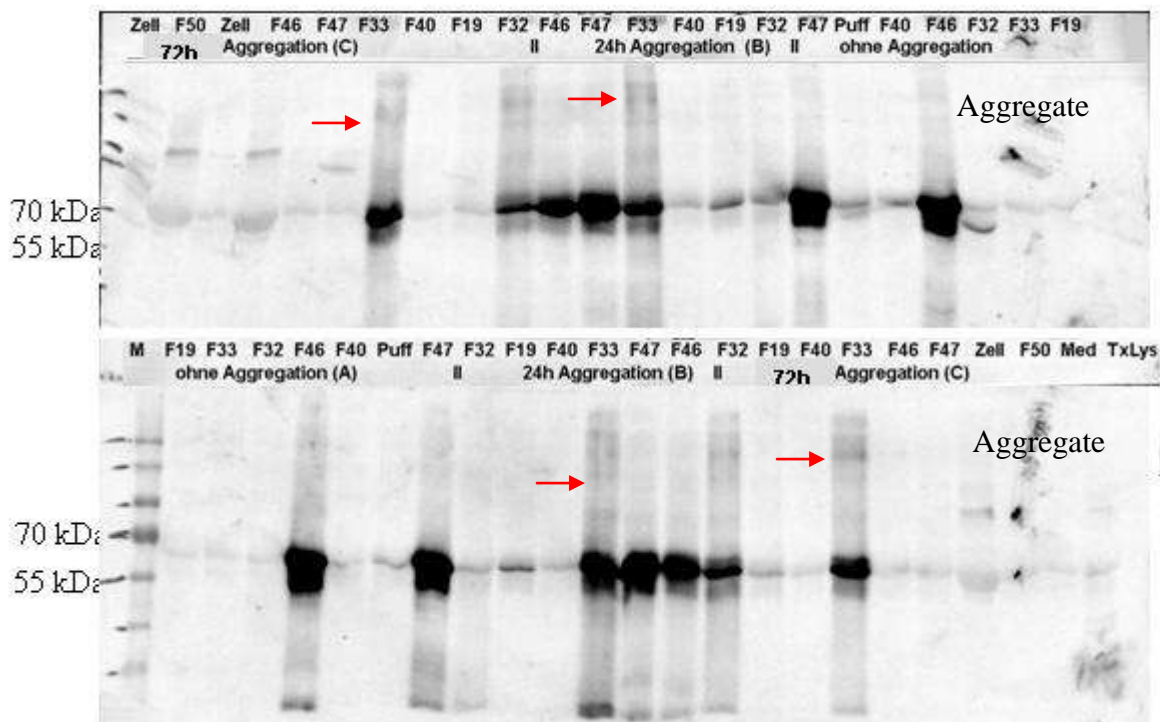


Abbildung 31: Nachweis des Tau-Proteins nach dem MTT-Test im Western Blot mittels polyklonalem anti-Tau-Antikörper in verschiedenen Fraktionen (nach 24h, 72h-Aggregation sowie unaggregierter Ansatz) zur Untersuchung der Tau-Protein-Stabilität

5 Diskussion

Der Inhalt meiner Arbeit bestand aus einer Präparation, bei welcher die Reinigung der rekombinanten humanen 2N4R-Tau-Isoform aus transformierten *E.coli*-Zellen durchgeführt wurde und der Analyse der Tau-Aggregationsverlaufes in Abhängigkeit von der Aggregationszeit.

Die durchgeführten Experimente sollten die Tau-Protein-Aggregation genauer charakterisieren. Hierbei stellte sich heraus, dass zunächst, wie erwartet, mit steigender Aggregationsdauer zunehmend Oligomere und anschließend dicht gepackte Filamente gebildet werden. Allerdings war in unserem Ansatz mit der längsten Aggregationsdauer (120h) Tau-Monomer vorhanden, welches bei einer Aggregationszeit von 72h bereits nahezu vollständig aggregiert war. Die Assays der drei Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescamin (misst den Gesamtproteingehalt), ANS (erkennt amyloidogene Bereiche) und Thioflavin S (detektiert β -Faltblattstrukturen) zeigten Ergebnisse, welche dieses Phänomen erklären könnten: ANS reagiert nicht mit dem unaggregierten Tau-Protein, wie es bei den kurz- und mittelfristig inkubierten Aggregationsansätzen auch der Fall war. Allerdings zeigte ANS in Verbindung mit dem Monomer des 120h- Aggregationsansatzes eine Fluoreszenzaktivität. Diese ungewöhnliche Reaktion deutet darauf hin, dass die zunächst gebildeten Oligomere und/oder Filamente nicht stabil sind und wieder in Monomere zerfallen. Das Besondere an diesem Zerfall ist, dass die Monomere offenbar ihre (oligomertypische) amyloidogene Struktur beibehalten, da nur dies die Reaktivität mit ANS erklärt.

Möglich wäre, dass diese aus Oligomeren zerfallenen Monomere aufgrund ihrer besonderen Struktur Induktor einer erneuten Tau-Protein-Aggregation darstellen und diese damit weiterverbreiten, obwohl Monomere unter physiologischen Bedingungen nicht aggregieren. Diese Vermutung rührt von der Erkenntnis, dass aggregiertes Tau-Protein selbst die Aggregation von Tau-Monomeren induzieren kann [Clavaguera et al., 2009]

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die verschiedenen Aggregationen zweimal durchgeführt. Allerdings mit dem Unterschied, dass bei dem zweiten Versuch alle Aggregationsansätze in einem Reaktionsgefäß inkubiert wurden und zu gegebener Zeit das entsprechende Volumen entnommen wurde und nicht, wie im ersten Versuch, jeder Aggregationsansatz getrennt voneinander in einzelnen Aliquoten angesetzt wurde. Dies sollte Schwankungen der Tau-Heparin-Konzentration durch eventuelle Pipettierfehler verhindern, da der Einfluss des Heparins als Induzierer der Protein-Aggregation sehr stark

von seiner Konzentration bestimmt ist [Carlson et al., 2007]. Allerdings kam es bei diesem zweiten Durchlauf zu einem beschleunigten veränderten Aggregationsverhalten. Dies könnte zum einen daran liegen, dass der Gesamtaggregationsansatz größer war und somit trotz gleicher Tau-Heparin-Konzentration ein anderes Aggregationsverhalten zu verzeichnen ist. Zum anderen könnte es von Bedeutung sein, dass die Temperatur in dem Brutschrank, in welchem die Aggregationsansätze inkubiert wurden, vor allem bei dem zweiten Durchlauf schwankte. Es ist bereits bekannt, dass die Tau-Protein-Aggregation, wie die meisten anderen biochemischen Vorgänge, von der Temperatur abhängig ist [Jeganathan et al., 2008]. In einem neuen Versuch wäre es somit von Bedeutung, zunächst die Funktionalität der verwendeten Brutschränke zu überprüfen, um eine konstante Temperatur während der Aggregationsdauer zu gewährleisten.

Die durchgeführten Fluoreszenzassays verliefen ohne weitere Probleme oder Widersprüche. Die einzige Besonderheit, die Reaktion des ANS mit den Monomeren des 120h-Ansatzes, kann mit den zerfallenen Oligomeren (oder Filamenten) erklärt werden.

Die durchgeführten Zytotoxizitätstests zeigten, entgegen unserer Vermutung, keine besondere Toxizität der Tau-Oligomere. Die Ergebnisse des LDH- sowie MTT-Testes zeigten weitgehend ähnliche Werte zwischen den Filamenten und Oligomeren, was auf eine ähnliche geringe Toxizität der Filamente hindeutet. Wie signifikant diese Ergebnisse sind, bleibt allerdings offen. Der Einfluss der Bakterien auf die Vitalitäts-Assays kann zwar nahezu ausgeschlossen werden, allerdings sollten diese Tests trotzdem noch einmal durchgeführt werden. Hierbei könnte eine erneute Kontamination kaum ausgeschlossen werden, da eine sterile Arbeitsweise aufgrund des komplizierten Versuchsaufbaus und der nicht sterilen Gelfiltration nahezu unmöglich ist. Insbesondere fehlt unseren Daten die Signifikanz, da wir nicht sicher sein können, vergleichbare Konzentrationen an filamentösem, oligomerem, bzw. monomerem Tau in den entsprechenden Fraktionen zu haben. So könnte eine relativ hohe Konzentration weniger toxischer Filamente einen ähnlichen Effekt wie eine geringere Konzentration von toxischen Oligomeren auslösen. Die verwendete Form der Sechsfachbestimmung sollte in jedem Fall beibehalten werden, da diese Methoden sehr empfindlich gegenüber Schwankungen sind. Mögliche Schwankungen reichen von unterschiedlich dicht ausgesäten Zellen über die Konzentration der Tau-Aggregationsintermediate oder der MTT- bzw. LDH-Substanz bis hin zu verschiedenen Bedingungen zwischen dem Rand und der Mitte der 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle der MTT- und LDH-Assays, den (proteolytischen) Abbau der Proteine während der Inkubation, kann nach dem durchgeführten Western-Blot ausgeschlossen werden. Auch nach dem MTT-Test konnte mithilfe eines polyklonalen Tau-Antikörpers in ausgewählten Proben das Tau-Protein nachgewiesen werden. Zumindest während der Inkubation kann ein Zerfall der Oligomere weitgehend ausgeschlossen werden, da im Western-Blot ebenfalls höhermolekulare Oligomerbanden („Oligomerschmiere“) zu verzeichnen waren. Die Methoden LDH- und MTT-Test funktionieren also grundlegend und müssten nur zur Verifizierung noch einmal wiederholt werden, wenn möglich, mit gleicher Filament- Oligomer- und Monomerkonzentration.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind von besonderer Bedeutung für die Forschung im Hinblick auf die AD. Die Aggregation des Tau-Proteins wurde, als eine ihrer Hauptpathologien, bereits verstärkt zu charakterisieren versucht.

So konnte in anderen Experimenten durch eine ebenfalls Mediatoren-vermittelte Aggregation typische amyloidogene Tau-Aggregation nachgewiesen werden: eine Erhöhung der Tau-Konzentration, eine geringere Bindung an die Mikrotubuli, sowie die Bildung cytoplasmatischer Filamente [Bandyopadhyay, 2007]. Erst durch diese Erkenntnis konnte davon ausgegangen werden, dass *in vitro*-Versuche der Form, wie wir sie durchgeführt haben, eine Bedeutung für eine mögliche Therapie gegen die AD haben können.

Dies beweist die Relevanz der Thematik der Tau-Protein-Aggregation im Rahmen der AD. Besonders ist an den hier beschriebenen Experimenten hervorzuheben, dass erstmalig das Tau-Protein vor einem Aggregationsexperiment aufgereinigt wurde. Die Sephacryl S-300 Gelfiltration als Teil der Protein-Aufreinigung ist hierbei von besonderer Bedeutung, da infolgedessen ausschließlich Tau-Monomer in dem Versuchsansatz vorhanden ist. Erst durch diese Tatsache ist es möglich, signifikante Ergebnisse des Tau-Protein-Aggregationsverlaufes zu erhalten. Somit wird die einzig nicht-physiologische Komponente auf den Aggregationsmediator (hier Heparin) begrenzt. Die Zugabe eines solchen ist allerdings notwendig, da eine *in vitro*-Aggregation ansonsten so gut wie unmöglich ist [Bandyopadhyay, 2007].

Es wurde in anderen Veröffentlichungen bereits beschrieben, dass sich während der Tau-Protein-Aggregation metastabile Aggregate bilden, welche wieder zerfallen. Allerdings

wurde in den geschilderten Experimenten keine Aufreinigung des Tau-Proteins durchgeführt, was den Einfluss von anderen Proteinen o.Ä. ausschließt. [Li et al., 2008]

Eine weitere Überlegung ist, dass die Toxizität der Oligomere darauf beruht, dass diese ein Mediator in der A β -Pathologie der AD sind [Lasagna-Reeves et al., 2010].

Desweiteren wurden in keiner bisherigen Veröffentlichung einzelne, aufgetrennte Aggregationsintermediate auf ihre Toxizität untersucht. Durch die Sephacryl S-500 Gelfiltration war es möglich, Filamente, Oligomere und Monomere voneinander zu trennen und diese anschließend einzeln zum Zwecke der Toxizität mit SY5Y-Zellen in zu inkubieren.

Die gewonnenen Erkenntnisse geben also Raum für die weitere Forschung in Bezug auf Behandlungsmöglichkeiten gegen die AD. Es sollte jedoch beachtet werden, dass biologische Modelle nicht die gleichen Aggregationsbedingungen wie bei der AD widerspiegeln, was eine Übertragung auf das Krankheitsbild erschwert [Honson & Kuret, 2008].

6 Resümee und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Zeitverlauf der Tau-Protein-Aggregation charakterisiert werden konnte: mit steigender Aggregationsdauer bilden sich zunehmend Oligomere und Filamente, welche allerdings nicht sehr stabil sind und wieder in Monomere zerfallen können, welche allerdings amyloidogene Strukturen behalten.

Bei der Charakterisierung der Toxizität der Intermediate konnte eine besondere Toxizität der Oligomere, wie sie zunächst vermutet wurde, nicht nachgewiesen werden.

Generell stellt sich die Frage, ob die von uns als Filamente, bzw. Oligomere betitelten Intermediate wirklich ebendiese sind. Dies beruht nur auf Vermutungen, da wir bisher keine Möglichkeit hatten, die tatsächliche Molekulargröße der gebildeten und anschließend aufgetrennten „Filamente“ und „Oligomere“ zu bestimmen. Dies wäre allerdings, im Rahmen einer erneuten Versuchsdurchführung mit einer Erweiterung des Versuchsaufbaus möglich. Zu verwendende Methoden wären Elektronenmikroskopie und/oder „Dynamic light scattering“.

7 Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Arendt für die Ermöglichung meines Praktikums im Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung „Molekulare und zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration“.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Röbbke Wünschiers für die Betreuung von Seiten der Hochschule und die zeitnahe Beantwortung von Fragen.

Ich danke PD Dr. Max Holzer für die Betreuung, eingeschlossen die geduldige Einarbeitung und Unterstützung im Labor sowie die Beantwortung fachlicher Fragen. Isabel Hilbrich danke ich ebenfalls für die Unterstützung im Labor, für die Hilfe bei den durchgeführten Zellkulturversuchen und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des PFI Leipzig, die mich in eventuellen Fragen stets berieten und bei Problemen unterstützten.

Ebenfalls möchte ich mich bei Anne, Caro und Jule als Außenstehende für das Korrekturlesen in Eile bedanken. Vor allem aber bei Alexandra, Karin und Kora!

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich in der Zeit der Bearbeitung dieser Arbeit nicht nur finanziell, sondern in jeglicher Hinsicht unterstützten und mir stets neuen Mut zusprachen.

Referenzen

Avila, J.; Santa-Maria, I.; Pérez, M.; Hernández, F.; Moreno, F.: Tau Phosphorylation, Aggregation and Cell Toxicity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2006, 74539: 1–5

Barghorn, S.; Mandelkow, E.: Toward a Unified Scheme for the Aggregation of Tau into Alzheimer-Paired Helical Filaments. *Biochemistry* 2007, 41: 14885 – 14896

Bandyopadhyay, Bhaswate; Li, Guibin; Yin, Haishan; Kuret, Jeff: Tau Aggregation and Toxicity in a Cell Culture Model of Tauopathy. *The Journal of biological chemistry* 2007, 282: 16454 – 16464

Berg, Richard; Franzen, Michael; Wedding, Danny: Nachweis von Hirnfunktionsstörungen: neuropsychologische Untersuchungen für die Praxis. Dt. Lizenzausgabe, Köln: Dt. Ärzte-Verl., 1994

Brunden, Kurt R.; Trojanowski, John. O; Lee, Virginia M.-Y.: Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature Reviews Drug Discovery* 2009, 8: 783-791

Buée L, Bussi re T, Bu e-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR.: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000, 33(1): 95-130

Carlson SW, Branden M, Voss K, Sun Q, Rankin CA, Gamblin TC: A complex mechanism for inducer mediated tau polymerization. *Biochemistry.* 2007, 46(30):8838-49

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M.: Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009, 11(7):909-13

Cleveland, D.W.; Hwo, S.Y.; Kirschner, M.W.: Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J.Mol.Biol.* 1977, 116(2):227-247

Cleveland, Don W.; Hwo, Shu-Ying; Kirschner, Marc W.: Purification of Tau, a Mikrotubuli-associated Protein that Induces Assembly of Microtubules from Purified Tau. *Journal of Molecular Biology* 1977, 166: 207 – 225

Crowther, R.A.; Goedert, M.: Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *Journal of Structural Biology*, Juni 2000, 130(2-3): 271-279

Ding, Huiping; Johnson, Gail V.W.: The Last Tangle of Tau. *National Institutes of Health* 2008, 14(4): 441 – 447

Friedhoff, P.; von Bergen, M.; Mandelkow, E.-M.; Davies, P; Mandelkow, E.: A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *PNAS* 1998, 95: 15712 – 15717

Graf, Peter: Lifespan development of human memory. Cambridge: MIT Press, 2002

Grundke-Iqbal, Inge; Iqbal, Khalid; Tung, Yunn-Chyn; Quinlan, Maureen; Wisniewski, Henryk M; Binder, Lester I.: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein τ (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *PNAS* 1986, 83: 4913 – 4917

Gutzmann, Hans: Das Wichtigste 6 - Die nichtmedikamentöse Behandlung der Alzheimer-Krankheit. URL: <http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet06.pdf>, verfügbar am 06.01.2010

Hirokawa, Nobutaka; Shiomura, Yoko; Okabe, Shigeo: Tau Proteins: The Molecular Structure and Mode of Binding on Microtubules. *The Journal of Cell Biology* 1988, 107: 1449 – 1459

Honson, Nicolette S.; Kuret, Jeff: Tau aggregation and toxicity in tauopathic neurodegenerative diseases. *National Institutes of Health* 2008, 14(4): 417-422

Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E.: The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry*, 2008, 47(40):10526-39

Kovacech, Branislav; Skrabana, Rostislav; Novak, Michal: Transition of Tau Protein from Disordered Misordered in Alzheimer's Disease. Karger 2010, 7: 24 – 27

Kurz, Alexander: Das Wichtigste 5 - Die medikamentöse Behandlung der Alzheimer-Krankheit. URL: <<http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet05.pdf>>, verfügbar am 06.01.2010

Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muoz MJ, Jackson GR, Kayed R.: Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. Biochemistry, 2010, 49(47):10039-41

Le Corre, Sylvie et al.: An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. PNAS. 2004, 25: 9673-9678

Lee, Virginia M.-Y.; Kenyon, Theresa K.; Trojanowski, John O: Transgenic animal models of tauopathies. Biochemica et Biophysica Acta. Elsevier. 2005, 1739: 251 – 259

Li, Da-Wei; Mohanty, Sandipan; Irbäck: Anders; Huo, Shuanghong Huo: Formation and Growth of Oligomers: A Monte Carlo Study of an Amyloid Tau Fragment. PLOS Computational Biology 2008, 4: 1-12

McGeer, Patrick L.; McGeer, Edith: NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. Neurobiology of Aging. 2007, 28: 639-647

Mudher, Amritpal; Lovestone, Simon: Alzheimer's disease – do tauists and Baptists finally shake hands?. Trends in Neurosciences. 2002, 25: 22-25

Nonaka, Takashi; Watanabe, Sayuri T.; Iwatsubo, Takeshi; Hasegawa, Masato: Seeded Aggregation and Toxicity of α -Synuclein and Tau: Cellular Models of Neurodegenerative Diseases. The Journal of Biological Chemistry 2010, M110.148460: 1 – 24

Wolfe, Michael S.: Therapeutic strategies für alzheimer's disease. In: Nature Reviews Drug Discovery. 2002, 1: 859-865

Rogers, Joseph; Shen, Yong: A Perspective on Inflammation in Alzheimer's disease. Ann. NY Acad. Sci., 2000, 924: 132 - 135

Schneider, A.; Falkai, P.; Papassotiropoulos, A.: Molekulare Grundlagen Tau-Protein-vermittelter Toxizität. Der Nervenarzt 2010, DOI 10.1007/s00115-010-3052-2: 1 – 6

Sadqi, Mourad; Hernández, Felix; Pan, UnMei; Pérez, Mar; Schaeberle, Michael D.; Ávila, Jesús; Muñoz, Victor: α -Helix Structure in Alzheimer's Disease Aggregates of Tau-Protein. Biochemistry 2002, 41: 7150 – 7155

Von Bergen, Martin; Barghorn, Stefan; Biernat, Jacek; Mandelkow, Eva-Maria; Mandelkow, Eckard: Tau Aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. Elsevier 2005, 1739: 158 – 166

Wang, Y.; Krüger, U.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E.-M.: Generation of Tau Aggregation and Clearance by Autophagy in an Inducible Cell Model of Tauopathy. Karger 2010, 7: 103 – 107

Yao, Tian-Ming; Tomoo, Koji; Ishida, Toshimasa; Hasegawa, Hiroshi; Sasaki, Masashiro; Taniguchi, Taizo: Aggregation Analysis of the Microtubule Binding Domain in Tau Protein by Spectroscopic Methods. The Journal of Biochemistry 2003, 134: 91 – 99

Autor unbekannt: Morbus Alzheimer - Definition.

[URL I]: <<http://www.deutscheklinik.de/Patient/Erkrankungen/Alterserkrankungen/Morbus-Alzheimer/>>, verfügbar am 06.01.2010

Was ist Demenz? Was ist Alzheimer?.

[URL II]: <<http://www.alzheimerinfo.de/alzheimer/demenz-alzheimer/>> , verfügbar am 06.01.2010

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

Leipzig, im Dezember 2010